

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos

**MODELAGEM PREDITIVA DE CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* E
Byssochlamys nivea EM SUCOS DE FRUTAS**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-
Graduação em Engenharia de Alimentos como
requisito parcial para obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Desenvolvimento de
Processos da Indústria de Alimentos.

PATRÍCIA ALVES LEAL

Orientadora: Professora Doutora Gláucia Maria Falcão de Aragão

Co-orientadora: Professora Doutora Pilar Rodriguez de Massaguer

Florianópolis, agosto de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos

PATRÍCIA ALVES LEAL

MODELAGEM PREDITIVA DE CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* E
***Byssochlamys nivea* EM SUCOS DE FRUTAS**

Florianópolis, agosto de 2007

“A maior recompensa do nosso trabalho
não é o que nos pagam por ele, mas
aquilo em que ele nos transforma.”

John Ruskin

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha mãe TEREZINHA ALVES DE SOUZA pelo amor, carinho e apoio durante toda a minha vida e ao meu pai WILIAM DA CRUZ LEAL pois, mesmo à distância, se fez sempre presente em minhas decisões. Também agradeço ao meu padraсто AÍLSON TORRES DE ALMEIDA, pelo afeto, palavras amigas e ensinamentos.

Ao meu namorado, JOSÉ GUILHERME CHALLITA, pelo amor, carinho, cumplicidade e pelas idas ao laboratório de madrugada que foram indispensáveis para a conclusão desse trabalho.

À minha orientadora, GLÁUCIA MARIA FALCÃO DE ARAGÃO, por ter me incentivado a fazer mestrado, por ter me aceitado no projeto, pela paciência nos momentos difíceis, pelas críticas e correções e pelo apoio sempre presente.

À minha co-orientadora, PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER, pela contribuição essencial ao final deste projeto e na realização desta dissertação, com idéias e ferramentas que tornou este trabalho melhor. Também pelo carinho e paciência quase maternal.

Aos membros da banca examinadora, JOSÉ CARLOS CUNHA PETRUS, CLEONICE SARMENTO e SANDRA REGINA SALVADOR FERREIRA, pelas críticas e correções tão fundamentais.

À bolsista, ADRIANE MARANHO, que me ajudou a realizar esta pesquisa com muita disposição.

A todos os colegas de laboratório, que de alguma forma me ajudaram, seja no desenvolvimento da pesquisa ou na conversa entre um ensaio e outro.

Ao BRUNO AUGUSTO MATTAR CARCIOFI e ao CRISTIANO ÉDIO DANNENHAUER, pelo desenvolvimento do programa Project MMP, que me auxiliou em várias análises.

Ao Projeto PRODETAB, pelo apoio financeiro.

Dedico esta obra a Maria José de Souza, avó amada, de quem sinto muita falta, pelo amor, carinho e sorriso em todos os momentos. Também por ter me ensinado a nunca desejar o mal a ninguém.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	15
NOMENCLATURA	19
RESUMO	20
ABSTRACT	23
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	26
CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
1. FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES	31
1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS (SUB-REINO ASCOMICETO)	31
1.2. PRINCIPAIS ESPÉCIES	32
1.2.1. <i>Byssochlamys</i>	32
1.2.2. <i>Neosartorya fischeri</i>	33
1.3. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS	34
1.3.1. Produção de Enzimas	34
1.3.2. Produção de Micotoxinas	35
1.4. ALIMENTOS SUSCEPTÍVEIS À CONTAMINAÇÃO	37
1.5. PRODUÇÃO E COLETA DOS ASCÓSPOROS	39
1.6. ATIVAÇÃO DOS ASCÓSPOROS	41
1.7. FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES	42
1.7.1. Boas Práticas de Fabricação (BPF)	43
1.7.2. Temperatura de Estocagem dos Alimentos	44
1.7.3. Atividade de Água ou Teor de Sólidos Solúveis do Produto	45
1.7.4. pH ou Presença de Ácidos Orgânicos	47
1.7.5. Tempo e Temperatura de Produção dos Ascósporos	47
2. CONSUMO DE BEBIDAS À BASE DE FRUTAS	49
3. MICROBIOLOGIA PREDITIVA	51
3.1. OBJETIVOS E APLICAÇÕES	51
3.2. MODELOS PREDITIVOS	52
3.2.1. Modelos Primários	55
3.2.1.1. Modelo de Gompertz Modificado	56
3.2.1.2. Modelo Logístico	58
3.2.2. Modelos Secundários	59
3.2.2.1. Modelo da Raiz Quadrada	59
3.2.3. Modelos Terciários	60
3.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO	60
3.3.1. Avaliação do Crescimento de Fungos	61
3.4. MICROBIOLOGIA PREDITIVA NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS	62
CAPÍTULO III: MATERIAL E MÉTODOS	64
1. FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES	65
1.1. MICRORGANISMOS ESTUDADOS	65
1.2. PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES	65
1.3. COLETA DOS ASCÓSPOROS DAS GARRAFAS DE ROUX	65
1.4. QUANTIFICAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS	66

2. MEIOS DE CRESCIMENTO	67
2.1. SUCOS DE FRUTAS	67
2.2. PADRONIZAÇÃO DOS SUCOS	67
2.2.1. Determinação da acidez	67
2.2.2. Determinação do °Brix	68
2.2.3. Determinação do <i>Ratio</i>	68
2.2.4. Ajuste dos valores de <i>Ratio</i>	68
2.2.4.1. Baixos valores de <i>Ratio</i>	68
2.2.4.2. Elevados valores de <i>Ratio</i>	68
3. ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS	69
3.1. MÉTODOS TESTADOS	69
3.1.1. Método de Medida da Densidade Ótica ou Absorbância	69
3.1.2. Método de Medida do Peso Seco	70
3.1.3. Método de Medida do Diâmetro da Colônia	71
3.2. METODOLOGIA ESCOLHIDA	72
4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONÁRIO	72
5. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	74
5.1. TRATAMENTO DOS DADOS DE CRESCIMENTO	75
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PERFORMANCE DOS MODELOS	76
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
1. MÉTODOS DE MEDIDA DE CRESCIMENTO	79
1.1. MEDIDA DE CRESCIMENTO POR DENSIDADE ÓTICA E ABSORBÂNCIA	79
1.1.1. Crescimento de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de abacaxi a 30°C	79
1.1.2. Crescimento de <i>Byssoschlamys nivea</i> em suco de abacaxi a 30°C	80
1.2. MEDIDA DE CRESCIMENTO POR PESO SECO	81
1.2.1. Crescimento de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de abacaxi a 25°C e 30°C	81
1.2.2. Crescimento de <i>Byssoschlamys nivea</i> em suco de abacaxi a 25°C e 30°C	83
1.3. MEDIDA DE CRESCIMENTO PELA MEDIDA DE DIÂMETRO DA COLÔNIA	84
1.3.1. Modelagem primária de crescimento de <i>Neosartorya fischeri</i> em suco de abacaxi a 22°C, 25°C e 28°C	84
1.3.2. Modelagem primária do crescimento de <i>Byssoschlamys nivea</i> em suco de abacaxi a 22°C, 25°C e 28°C	86
2. EFEITO DA TEMPERATURA DE ESTOCAGEM DO SUCO NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES	88
2.1. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE <i>Neosartorya fischeri</i> EM SUCO DE ABACAXI - MODELAGEM SECUNDÁRIA	88
2.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE <i>Byssoschlamys nivea</i> EM SUCO DE ABACAXI - MODELAGEM SECUNDÁRIA	91
3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, <i>RATIO</i> E ESPAÇO LIVRE DA GARRAFA NO CRESCIMENTO DE <i>Neosartorya fischeri</i> EM SUCO DE ABACAXI	93
3.1. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO E DO MODELO LOGÍSTICO	95
3.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO DE <i>Neosartorya fischeri</i> EM SUCO DE ABACAXI	97

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO	101
3.3.1. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em λ para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi	102
3.3.2. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em μ_{\max} para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi	106
3.3.3. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em A para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi	109
4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, <i>RATIO</i> E ESPAÇO LIVRE DA GARRAFA NO CRESCIMENTO DE <i>Byssoschlamys nivea</i> EM SUCO DE ABACAXI	112
4.1. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO E DO MODELO LOGÍSTICO	113
4.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO DE <i>Byssoschlamys nivea</i> EM SUCO DE ABACAXI	115
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO	119
4.3.1. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em λ para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi	120
4.3.2. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em μ_{\max} para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi	123
4.3.3. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em A para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi ...	125
5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, <i>RATIO</i> E ESPAÇO LIVRE DA GARRAFA NO CRESCIMENTO DE <i>Neosartorya fischeri</i> EM SUCO DE MAMÃO	128
5.1. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO E DO MODELO LOGÍSTICO	129
5.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO DE <i>Neosartorya fischeri</i> EM SUCO DE MAMÃO	131
5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO	135
5.3.1. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em λ para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	136
5.3.2. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em μ_{\max} para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão	140
5.3.3. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em A para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão	143
6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, <i>RATIO</i> E ESPAÇO LIVRE DA GARRAFA NO CRESCIMENTO DE <i>Byssoschlamys nivea</i> EM SUCO DE MAMÃO	146

6.1. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO E DO MODELO LOGÍSTICO.....	147
6.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO DE <i>Byssochlamys nivea</i> EM SUCO DE MAMÃO.....	149
6.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO	153
6.3.1. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em λ para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão	154
6.3.2. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em μ_{\max} para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão	157
6.3.3. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, <i>ratio</i> do suco e espaço livre da garrafa em A para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão....	159
7. COMPARAÇÃO ENTRE <i>Neosartorya fischeri</i> E <i>Byssochlamys nivea</i> NOS DOIS MEIOS DE CRESCIMENTO TESTADOS.....	162
8. COMPARAÇÃO ENTRE <i>Neosartorya fischeri</i> E <i>Byssochlamys nivea</i> EM TERMOS DE FATORES SIGNIFICATIVOS.....	168
CAPÍTULO V: CONCLUSÕES.....	170
CAPÍTULO VI: SUGESTÕES.....	174
CAPÍTULO VII: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	176
PUBLICAÇÕES	197
ANEXO I: AJUSTE DOS MODELOS DE GOMPERTZ MODIFICADO E LOGÍSTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS	203
ANEXO II: AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DOS MODELOS DE GOMPERTZ MODIFICADO E LOGÍSTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS	228

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Curva Típica de Crescimento Microbiano	55
Figura 3.1. Frascos Erlenmeyer contendo suco de abacaxi inoculado com <i>N. fischeri</i> (letra N no frasco) e com <i>B. nivea</i> (letra B no frasco).	70
Figura 3.2. (a) Garrafas PET contendo suco de abacaxi inoculado, em suporte inclinado a 45°. (b) Lupa....	72
Figura 4.1. Dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> , obtido por absorbância a 400 nm, em suco de abacaxi incubado a 30°C.	79
Figura 4.2. Dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> , obtido por absorbância a 400 nm, em suco de abacaxi incubado a 30°C.	80
Figura 4.3. Dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> , obtidos por filtração e peso seco, em suco de abacaxi incubado a 30°C.	81
Figura 4.4. Dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> , obtido por filtração e peso seco, em suco de abacaxi incubado a 25°C.	82
Figura 4.5. Dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> , obtido por filtração e peso seco, em suco de abacaxi incubado a 30°C.	83
Figura 4.6. Dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> , obtido por filtração e peso seco, em suco de abacaxi incubado a 25°C.	83
Figura 4.7. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados de crescimento de <i>N. fischeri</i> , obtido por medida do diâmetro, em suco de abacaxi incubado a 22°C, 25°C e 28°C.	84
Figura 4.8. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados de crescimento de <i>B. nivea</i> , obtido por medida do diâmetro, em suco de abacaxi incubado a 22°C, 25°C e 28°C.	86
Figura 4.9. Relação entre (a) \sqrt{A} , (b) $\sqrt{\mu_{\max}}$, (c) $\sqrt{\lambda}$ e a temperatura para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	89
Figura 4.10. Relação entre (a) \sqrt{A} , (b) $\sqrt{\mu_{\max}}$, (c) $\sqrt{\lambda}$ e a temperatura para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	92
Figura 4.11. Valores de diâmetro observados versus valores de diâmetro preditos pelos modelos de Gompertz Modificado (a) e Logístico (b) para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	97
Figura 4.12. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o maior (6) e o menor (7) tempo de adaptação para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	99
Figura 4.13. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram a menor (5) e a maior (7) velocidade específica máxima de crescimento para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	100
Figura 4.14. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o menor (4) e o maior (11) diâmetro máximo atingido pela colônia para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	101
Figura 4.15. Gráfico de Pareto dos efeitos para a variável λ_1 para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	104
Figura 4.16. Valores de diâmetro observados versus valores de diâmetro preditos pelos modelos de Gompertz Modificado (a) e Logístico (b) para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	115
Figura 4.17. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram a maior (4) e a menor (7) duração da fase de adaptação para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	117
Figura 4.18. Comparação entre as curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram a maior (3) e a menor (5) velocidade específica máxima de crescimento para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	118
Figura 4.19. Comparação entre as curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o maior (6) e o menor (5) diâmetro máximo atingido pela colônia para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	119
Figura 4.20. Valores de diâmetro observados versus valores de diâmetro preditos pelos modelos de Gompertz Modificado (a) e Logístico (b) para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	131
Figura 4.21. Comparação das curvas de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão nos Ensaios 6 e 10, que apresentaram o maior e o menor tempo de adaptação, respectivamente.	133
Figura 4.22. Comparação entre as curvas de crescimento nos ensaios que apresentaram a maior (8) e a menor (10) velocidade específica máxima de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	134
Figura 4.23. Comparação entre as curvas de crescimento nos ensaios que apresentaram o maior (7) e o menor (4) diâmetro máximo atingido pela colônia de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	135
Figura 4.24. Gráfico de Pareto dos efeitos para a variável λ_1 de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	138

Figura 4.25. Valores de diâmetro observados versus valores de diâmetro preditos pelos modelos de Gompertz Modificado (a) e Logístico (b) para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	149
Figura 4.26. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o maior (6) e o menor (10) tempo de adaptação para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	151
Figura 4.27. Comparação entre as curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram a maior (9) e a menor (6) velocidade específica máxima de crescimento para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	152
Figura 4.28. Comparação entre as curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o maior (9) e o menor (6) diâmetro máximo atingido pela colônia de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	152
Figura 4.29. Crescimento de (a) <i>N. fischeri</i> e (b) <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	163
Figura 4.30. Crescimento de (a) <i>N. fischeri</i> e (b) de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	164
Figura 4.31. Crescimento de <i>N. fischeri</i> em (a) suco de abacaxi e (b) suco de mamão.	166
Figura 4.32. Crescimento de <i>B. nivea</i> em (a) suco de abacaxi e (b) suco de mamão.	167
Figura A.1. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	204
Figura A.2. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.	204
Figura A.3. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	205
Figura A.4. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.	205
Figura A.5. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 4.	206
Figura A.6. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	206
Figura A.7. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.	207
Figura A.8. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	207
Figura A.9. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 4.	208
Figura A.10. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	208
Figura A.11. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	209
Figura A.12. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 1.	210
Figura A.13. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.	210

Figura A.14. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.	211
Figura A.15. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	211
Figura A.16. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	212
Figura A.17. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 3.	212
Figura A.18. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 4 e (b) Réplica 3.	213
Figura A.19. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.	213
Figura A.20. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 1.	214
Figura A.21. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 4.	214
Figura A.22. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 4.	215
Figura A.23. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.	216
Figura A.24. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro (Réplica 3).	216
Figura A.25. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.	217
Figura A.26. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	217
Figura A.27. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	218
Figura A.28. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.	218
Figura A.29. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.	219
Figura A.30. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.	219

Figura A.31. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	220
Figura A.32. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.	220
Figura A.33. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 4 e (b) Réplica 3.	221
Figura A.34. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	222
Figura A.35. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.	222
Figura A.36. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.	223
Figura A.37. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.	223
Figura A.38. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.	224
Figura A.39. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.	224
Figura A.40. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.	225
Figura A.41. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 3.	225
Figura A.42. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 4.	226
Figura A.43. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 4 e (b) Réplica 2.	226
Figura A.44. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão, obtido por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.	227

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Volume (em mil litros) de sucos tropicais prontos produzidos em 2006.....	50
Tabela 2.2. Participação dos sabores (%) de sucos prontos no mercado interno em 2006.....	50
Tabela 3.1. Planejamento experimental fracionário para avaliação da influência dos fatores: temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento do fungo, ratio e espaço livre no crescimento de <i>N. fischeri</i> e <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi e suco de mamão.	73
Tabela 3.2. Níveis do planejamento experimental para suco de abacaxi.....	73
Tabela 3.3. Níveis do planejamento experimental para suco de mamão.	73
Tabela 4.1. Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico para <i>N. fischeri</i> a 22°C, 25°C e 28°C.....	85
Tabela 4.2. Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico para <i>B. nivea</i> a 22°C, 25°C e 28°C.	87
Tabela 4.3. Valores de r^2 para verificar o ajuste do Modelo da Raiz Quadrada para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	89
Tabela 4.4. Valores de r^2 para verificar o ajuste do Modelo da Raiz Quadrada para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	92
Tabela 4.5. Análise estatística da diferença entre as réplicas para os parâmetros λ , μ_{\max} e A no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	94
Tabela 4.6. Análise estatística da diferença entre os modelos para os parâmetros λ , μ_{\max} e A no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	95
Tabela 4.7. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	96
Tabela 4.8. Parâmetros primários obtidos pelo modelo de melhor ajuste no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	98
Tabela 4.9. Média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação para as variáveis resposta λ , μ_{\max} e A das quatro repetições no Ensaio 7 (escolhido aleatoriamente) para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	102
Tabela 4.10. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	103
Tabela 4.11. Efeitos estimados para os fatores independentes e o valor de probabilidade em λ_1 para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	103
Tabela 4.12. Efeitos estimados para T_e e T para a variável λ_1 no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	104
Tabela 4.13. Efeitos estimados para os fatores independentes para λ_2 no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	105
Tabela 4.14. Efeitos estimados para T_e e T e valor de probabilidade para variável resposta λ_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	105
Tabela 4.15. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max 1}$ e $\mu_{\max 2}$ para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	106
Tabela 4.16. Efeitos estimados para os fatores independentes no valor de $\mu_{\max 1}$ para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	107
Tabela 4.17. Efeitos estimados para T_e e T para a variável $\mu_{\max 1}$ no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	107
Tabela 4.18. Efeitos estimados para os fatores independentes e valor de probabilidade para $\mu_{\max 2}$ para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	108
Tabela 4.19. Efeitos estimados para T_e , T e R e o valor de probabilidade, considerando $\mu_{\max 2}$ para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	108
Tabela 4.20. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A_1 e A_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	110

Tabela 4.21. Efeitos estimados para os fatores independentes e valor de probabilidade para A_1 para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	110
Tabela 4.22. Efeitos estimados para os fatores independentes e valor de probabilidade para A_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	111
Tabela 4.23. Efeito estimado de T_e e valor de probabilidade para A_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	111
Tabela 4.24. Análise estatística da diferença entre as réplicas para os parâmetros λ , μ_{\max} e A no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	112
Tabela 4.25. Análise estatística da diferença entre os modelos para os parâmetros λ , μ_{\max} e A no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	113
Tabela 4.26. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	114
Tabela 4.27. Parâmetros primários obtidos pelo modelo de melhor ajuste para o crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	116
Tabela 4.28. Média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação para as variáveis resposta λ , μ_{\max} e A das quatro repetições do Ensaio 7 (escolhido aleatoriamente) de crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	120
Tabela 4.29. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	121
Tabela 4.30. Efeitos estimados e valor da probabilidade para os fatores independentes em λ_1 para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	121
Tabela 4.31. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes na variável λ_2 para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	122
Tabela 4.32. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max 1}$ e $\mu_{\max 2}$ para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	123
Tabela 4.33. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 1}$ para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	124
Tabela 4.34. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 2}$ para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	124
Tabela 4.35. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A_1 e A_2 para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	125
Tabela 4.36. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_1 para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	126
Tabela 4.37. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_1 para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	126
Tabela 4.38. Efeitos estimados para R e HS em A_1 para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	127
Tabela 4.39. Efeitos estimados para os fatores independentes em A_2 para <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	127
Tabela 4.40. Análise estatística da diferença entre as réplicas para os parâmetros λ , μ_{\max} e A para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	128
Tabela 4.41. Análise estatística da diferença entre os modelos para os parâmetros λ , μ_{\max} e A de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	129
Tabela 4.42. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico no crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	130
Tabela 4.43. Parâmetros primários obtidos pelo modelo de melhor ajuste para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	132
Tabela 4.44. Média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação para as variáveis resposta λ , μ_{\max} e A das quatro repetições do Ensaio 11 (escolhido aleatoriamente) para crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	136
Tabela 4.45. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	137

Tabela 4.46. Efeitos estimados e valor da probabilidade para os fatores independentes em λ_1 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	137
Tabela 4.47. Efeitos estimados e valor de probabilidade para T e R em λ_1 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	138
Tabela 4.48. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em λ_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	139
Tabela 4.49. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores T e R em λ_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	139
Tabela 4.50. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max 1}$ e $\mu_{\max 2}$ para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	140
Tabela 4.51. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 1}$ para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	141
Tabela 4.52. Efeito estimado e valor de probabilidade para R em $\mu_{\max 1}$ para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	141
Tabela 4.53. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 2}$ para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	142
Tabela 4.54. Efeito estimado para o fator R em $\mu_{\max 2}$ de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	142
Tabela 4.55. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A_1 e A_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	143
Tabela 4.56. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_1 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	144
Tabela 4.57. Efeito estimado e valor de probabilidade para T em A_1 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	144
Tabela 4.58. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	145
Tabela 4.59. Efeito estimado e valor de probabilidade para o fator R em A_2 para <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.....	145
Tabela 4.60. Análise estatística da diferença entre as réplicas para os parâmetros λ , μ_{\max} e A de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	146
Tabela 4.61. Análise estatística da diferença entre os modelos para os parâmetros λ , μ_{\max} e A de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	147
Tabela 4.62. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	148
Tabela 4.63. Parâmetros primários de crescimento obtidos pelo modelo de melhor ajuste no crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	150
Tabela 4.64. Média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação para as variáveis resposta λ , μ_{\max} e A das quatro repetições no Ensaio 11 (escolhido aleatoriamente) para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	153
Tabela 4.65. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 para crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	154
Tabela 4.66. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em λ_1 para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	155
Tabela 4.67. Efeitos estimados para os fatores T _e , T e R em λ_1 para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	155
Tabela 4.68. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em λ_2 para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	156
Tabela 4.69. Efeitos estimados e valores de probabilidades para os fatores T e R em λ_2 para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	156
Tabela 4.70. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max 1}$ e $\mu_{\max 2}$ para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	157
Tabela 4.71. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 1}$ para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.....	158

Tabela 4.72. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 2}$ para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	158
Tabela 4.73. Efeitos estimados para o <i>ratio</i> em $\mu_{\max 2}$ para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	159
Tabela 4.74. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A_1 e A_2 para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	160
Tabela 4.75. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_1 para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	160
Tabela 4.76. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_2 para <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	161
Tabela 4.77. Maiores e menores valores para os parâmetros primários de crescimento de <i>N. fischeri</i> e <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi e suco de mamão.	162
Tabela 4.78. Resumo dos parâmetros significativos para λ , μ_{\max} e A para ambos os fungos a 95% de significância.	168
Tabela A.1. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico ao crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de abacaxi.	229
Tabela A.2. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico ao crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de abacaxi.	230
Tabela A.3. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico ao crescimento de <i>N. fischeri</i> em suco de mamão.	231
Tabela A.4. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico ao crescimento de <i>B. nivea</i> em suco de mamão.	232

NOMENCLATURA

CYA = Ágar Czapeck Extrato de Malte

G25N = Ágar Nitrato Glicerol 25%

MEA = Ágar Extrato de Malte

PDA = Ágar Batata Dextrose

Rpm = Rotações por minuto

UFC = Unidade formadora de colônia

μ_{\max} = Velocidade específica máxima de crescimento

λ = Duração da fase de adaptação

A = Diâmetro máximo atingindo pela colônia

$v_{\text{observado}}$ = Valores observados experimentalmente

v_{predito} = Valores preditos pelo modelo

T_e = Temperatura de formação dos esporos

T = Temperatura de crescimento do fungo

R = *Ratio* do suco

HS = Espaço livre da garrafa

RESUMO

Byssoschlamys nivea e *Neosartorya fischeri* são fungos termorresistentes usualmente relatados como deterioradores de suco de abacaxi e suco de mamão. Os ascósporos destes fungos podem sobreviver à pasteurização comercial usualmente aplicada a frutas e produtos de frutas e podem deteriorar tais produtos pela germinação e conseqüente crescimento sob condições de oxigênio reduzido, gerando grandes perdas econômicas. O primeiro objetivo deste trabalho foi estabelecer um método de medida que pudesse expressar o crescimento dos fungos. Foram testados três métodos: medida de absorbância, medida de peso seco e medida de diâmetro da colônia. O método que melhor representou o crescimento de *B. nivea* e *N. fischeri* foi o método da medida do diâmetro da colônia. Para a realização do mesmo, garrafas PET transparentes com 230 mL de suco pasteurizado foram inoculadas com 1 mL de ascósporos de cada fungo separadamente e o diâmetro da colônia foi medido a cada doze horas. O próximo passo foi modelar o crescimento destes fungos em suco de abacaxi, em temperaturas próximas à ambiente, para gerar dados para determinar a vida de prateleira deste produto. O crescimento de *B. nivea* e *N. fischeri* foi estudado a 22°C, 25°C e 28°C. As curvas de crescimento foram geradas pelo ajuste do diâmetro da colônia (mm) com o respectivo tempo (h) e os parâmetros de crescimento (duração da fase de adaptação – λ , velocidade específica máxima de crescimento – μ_{\max} e diâmetro máximo atingido pela colônia – A) foram obtidos ajustando os modelos de Gompertz Modificado e Logístico às curvas usando regressão não linear. A performance dos modelos foi avaliada pelo coeficiente de regressão (r^2), erro quadrado médio (MSE), fator Bias e fator de Exatidão. Para *N. fischeri*, μ_{\max} aumentou de 0,13 mm/h a 22°C para 0,54 mm/h a 28°C; A aumentou de 6,6 mm a 22°C para 20,1 mm a 28°C; e λ diminuiu de 212,2 h a 22°C para 107,4 h a 28°C. Para *B. nivea*, μ_{\max} aumentou de 0,35 mm/h a 22°C para 0,74 mm/h a 28°C; e λ diminuiu de 270,1 h a 22°C para 136,4 h a 28°C. Estes resultados mostraram que ao aumentar a temperatura de estocagem do suco de 22°C para 28°C, μ_{\max} aumentou e λ diminuiu para os dois fungos. Estes dados são úteis para estabelecer a vida de prateleira de sucos prontos para beber. Por fim, esta pesquisa procurou estudar o efeito da temperatura de formação dos ascósporos (25-35°C), da temperatura de crescimento do fungo (22-28°C), do *ratio* (10-38 para suco de abacaxi e 26-66 para suco de mamão) e da porcentagem de espaço livre na garrafa (8-28) no crescimento de ascósporos de *N. fischeri* e *B. nivea* inoculados em suco de abacaxi e em suco de mamão, usando a medida do diâmetro da colônia. Os ascósporos foram produzidos em garrafas de Roux com Ágar Extrato de Malte (pH 5,4) incubado a 25°C,

30°C e 35°C por 30 dias e coletados em água estéril, filtrado para remover as hifas, lavados e centrifugados duas vezes a 4000 rpm e estocados a 4°C antes do uso. Depois da ativação a 80°C por 30 minutos, a suspensão foi contada em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose. A suspensão de ascósporos ativados foi inoculada em garrafas PET contendo suco pasteurizado. O crescimento foi acompanhado pela observação em lupa da colônia na superfície do suco durante a estocagem do mesmo, medindo o diâmetro da colônia. Para a modelagem primária, os modelos de Gompertz Modificado e Logístico foram utilizados em ambos os sucos. Um planejamento fatorial fracionário de dois níveis e três pontos centrais foi selecionado para estudar os efeitos dos fatores nos parâmetros de crescimento (λ , μ_{\max} e A). Quatro diferentes réplicas foram utilizadas em cada experimento. A performance dos modelos utilizados foi avaliada pelo coeficiente de regressão (r^2), erro quadrado médio (MSE), fator Bias e fator de exatidão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o Statistica 6.0. A análise de variância ($p < 0,05$) foi usada para calcular os efeitos. As duas réplicas que apresentaram o menor e o segundo menor tempo de adaptação foram selecionadas em cada ensaio, representando as ocorrências visuais mais rápidas de crescimento dos fungos nos sucos. Não houve diferença significativa entre os parâmetros de crescimento λ , μ_{\max} e A ($p < 0,05$) calculados pelo modelo de Gompertz Modificado ou pelo Modelo Logístico para um ensaio específico mas, na maioria dos experimentos, o modelo de Gompertz Modificado representou melhor os dados do que o Modelo Logístico. Para *N. fischeri*, a maior duração da fase de adaptação observada no suco de abacaxi foi de 381,7 h, quando os ascósporos foram formados a 35°C, o suco estocado a 22°C, com alto *ratio* e baixo espaço livre na garrafa. Por outro lado, o menor λ (74,1 h) ocorreu quando os esporos foram formados a 25°C, o suco foi estocado a 28°C, o *ratio* foi elevado e o espaço livre da garrafa foi baixo. Para o mesmo fungo, no suco de mamão, o maior tempo de adaptação foi de 708,4 h, quando os ascósporos foram formados a 35°C, o suco foi estocado a 22°C, com alto *ratio* e baixo espaço livre na garrafa. O menor λ (93,7 h) ocorreu na condição central do planejamento. Analisando o efeito dos fatores no suco de abacaxi, a temperatura de formação dos esporos teve um efeito significativo ($p < 0,05$) em λ , μ_{\max} e A ; enquanto a temperatura de crescimento somente foi significativa em λ e μ_{\max} e o *ratio* somente em μ_{\max} . Em suco de mamão, o *ratio* teve um efeito significativo em μ_{\max} e A , enquanto a temperatura de crescimento influenciou significativamente somente em λ e A . O espaço livre não foi significativo na escala estudada em nenhum dos dois sucos. Para *B. nivea*, em suco de abacaxi, a maior duração da fase de adaptação foi de 726,7 h, quando os ascósporos foram formados a 35°C,

o suco foi estocado a 28°C, com *ratio* baixo e espaço livre baixo. Por outro lado, o menor λ (185,1 h) ocorreu quando os esporos foram formados a 25°C, o suco foi estocado a 28°C, com alto *ratio* e baixo espaço livre na garrafa. Para o mesmo fungo, no suco de mamão, o maior tempo de adaptação foi de 550,3 h, quando os ascósporos foram formados a 35°C, o suco foi estocado a 22°C, o *ratio* foi elevado e o espaço livre na garrafa foi baixo. O menor λ (162,1 h) ocorreu na condição central do planejamento. Analisando o efeito dos fatores em suco de abacaxi, nenhum fator estudado exerceu efeito significativo a 95% de significância; a 90% de significância o *ratio* se mostrou significativo em A. Em suco de mamão, o *ratio* teve um efeito significativo ($p < 0,05$) em λ e μ_{\max} ; enquanto a temperatura de formação dos esporos e a temperatura de estocagem do suco influenciaram significativamente somente em λ . O espaço livre não foi significativo na escala estudada em nenhum dos dois sucos.

ABSTRACT

Byssoschlamys nivea and *Neosartorya fischeri* are heat resistant molds usually related to pineapple and papaya juice spoilage. Ascospores of these molds can often survive to commercial pasteurization heat treatments usually applied to fruits and fruit products and may spoil such products by germination and subsequent growth under reduced oxygen conditions, resulting in great economic losses. The first objective of this research was to establish the best method to follow mold growth. Three methods were tested: absorbance, dry weight and surface colony diameter measurement. The most reproducible method for *B. nivea* and *N. fischeri* growth was the colony diameter method. For that, polyethylene terephthalate (PET) transparent bottles with 230 mL of pasteurized juice were inoculated with 1 mL of ascospores of each fungi (separately) and the colony diameter was measured as a function of time (every twelve hours). The next step was modeling the growth of these heat resistant fungi in pineapple juice at room temperatures to generate data to determine the shelf life of this product. *B. nivea* and *N. fischeri* growth was studied at 22°C, 25°C and 28°C. Growth curves, colony diameter (mm) *versus* time (hours), were generated and the growth parameters (lag time – λ , maximum specific growth rate – μ_{\max} and maximum colony diameter – A) were obtained fitting the Modified Gompertz and Logistic models to the curves using non-linear regression. The following parameters were calculated to evaluate the models: regression coefficient (r^2), mean square error (MSE), Bias and Accuracy Factor. For *N. fischeri*, μ_{\max} increased from 0.13 mm/h at 22°C to 0.54 mm/h at 28°C; A increased from 6.6 mm at 22°C to 20.1 mm at 28°C; and λ decreased from 212.2 h at 22°C to 107.3 h at 28°C. For *B. nivea*, μ_{\max} increased from 0.35 mm/h at 22°C to 0.74 mm/h at 28°C; and λ decreased from 270.1 h at 22°C to 136.4 h at 28°C. The results showed that when the juice storage temperature increased from 22°C to 28°C, μ_{\max} increased and λ decreased for both molds. The data obtained are useful for the establishment of the shelf life of ready to drink juices. Finally, this research aimed to study the effect of ascospore formation temperature (25-35°C), juice storage temperature (22-28°C), ratio (10-38 for pineapple and 26-66 for papaya juice) and head space percentage (8-28) on the growth of inoculated *Neosartorya fischeri* and *Byssoschlamys nivea* ascospores in pineapple and papaya juices, by measuring the colony diameter. Mold ascospores were produced in Roux bottle with Malt Extract Agar (pH 5.4) incubated at 25°C, 30°C and 35°C for 30 days and collected in sterile water, filtered to remove mycelium, washed and centrifuged twice at 4000 rpm, and stored at 4°C before use. After activation at 80°C for 30 min, suspension was counted by pour plating on PDA.

Activated ascospores suspension was inoculated in 250 mL PET bottles filled with of pasteurized juice. Growth was followed by microscopic observation of a colony in tilted bottle during juice storage, measuring the largest colony diameter. For primary growth modeling, Logistic and Modified Gompertz models were used for both juices. A 2^4 fractional factorial screening design, two levels, 3 central points was selected to study the factors effects on λ (h), μ_{\max} (mm/h), and A (mm). Four different replicates were followed in each experiment. The performance of the models was tested by regression coefficient (r^2), mean square error (MSE), Bias factor and accuracy factor. Statistical analysis was done using Statistics version 6. ANOVA ($p < 0.05$) was used to calculated net effects. Two replicates showing the shortest and the next shortest lag time were selected from each assay, representing the fastest occurrence of visual mold growth on the juice. There was no significant difference among the respective parameters λ , μ_{\max} e A ($p > 0.05$) calculated by the Logistic and the Modified Gompertz model for an specific assay, but in most experiments Modified Gompertz model better represented the data than the Logistic model. For *N. fischeri*, the largest λ (381.7 h) observed for pineapple juice, occurred when ascospores were formed at 35°C, and the juice stored at 22°C, with high ratio and low head space. On the other side, the lowest lag time (74.1 h) occurred when spore were formed at 25°C and juice storage temperature was 28°C, with high ratio and low head space, however both conditions decrease shelf life. For papaya juice, the largest λ (708.4 h) occurred when ascospores were formed at 35°C, and the juice stored at 22°C, with high ratio and low head space. On the other side, the lowest lag time (93.7 h) occurred at the central points of the experimental plan, as expected. Analyzing the factors effect on pineapple juice, spore formation temperature had a significant effect ($p < 0.05$) on λ , μ_{\max} and A; while storage temperature was also significant on λ and μ_{\max} and ratio was only significant on μ_{\max} . For papaya juice, ratio had a significant effect ($p < 0.05$) on μ_{\max} and A, while juice storage temperature influenced significantly only λ and A. Head space was not significant on the range studied for both juices. For *B. nivea*, the largest λ (726.7 h) observed for pineapple juice, occurred when ascospores were formed at 35°C, and the juice stored at 28°C, with low ratio and low head space. On the other side, the lowest lag time (185.1 h) occurred when spore were formed at 25°C and juice storage temperature was 28°C, with high ratio and low head space. For papaya juice, the largest λ (550.3 h) occurred when ascospores were formed at 35°C, and the juice stored at 22°C, with high ratio and low head space. On the other side, the lowest lag time (162.1 h) occurred at the central points of the experimental plan, as expected. Analyzing the factors effect on

pineapple juice, no significant factor was found at 95% of significance; at 90% of significance ratio was significant only for A. For papaya juice, ratio had a significant effect ($p < 0.05$) on λ and μ_{\max} , while spore formation temperature and juice storage temperature influenced significantly only λ . Head space was not significant on the range studied for both juices. Finally the effect of mold growth conditions on growth parameters depends on the substrate where the mold had grown.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

A atual demanda por produtos a base de frutas com características próximas a do produto *in natura* e de melhor qualidade nutricional é grande.

A produção de sucos de frutas ocupa papel relevante na indústria agrícola e é um dos mais promissores negócios do mundo em termos de comércio internacional, com importante participação dos países em desenvolvimento. Neste mercado, destacam-se os sucos de frutas tropicais, tais como laranja, caju, maracujá, abacaxi, goiaba, graviola, tamarindo, acerola, pitanga, umbu, mamão e açaí (Indi, 2007).

O consumo interno brasileiro de suco está em torno de 2 litros per capita; crescendo, em média, 15,58% ao ano (Indi, 2007). Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não-Alcoólicas (ABIR), de janeiro a setembro de 2006, o volume de sucos prontos produzidos no país foi de 283,8 milhões de litros, o que representa um crescimento de 13,5% sobre o mesmo período de 2005. O faturamento é de cerca de R\$ 800 milhões (Estado de Minas, 2006).

Este aumento da demanda de consumo de produtos a base de frutas e a preocupação cada vez maior com segurança alimentar tem levado à busca de processos capazes de preservar os produtos contra agentes deteriorantes como bactérias e fungos, sem ocasionar muita perda da qualidade do produto final. Os métodos freqüentes de preservação destes produtos são: a pasteurização e o processo UHT, sendo pouco freqüente o uso de conservantes químicos (Tournas, 1994).

A maioria dos fungos filamentosos apresenta limitada resistência ao calor, entretanto os fungos filamentosos termorresistentes são capazes de sobreviver à temperatura de pasteurização devido à sua característica de produzir ascósporos (Tournas & Traxler, 1994; Splittstoesser, 1991; Hocking & Pitt, 1984). O uso de altas temperaturas ativa os ascósporos dormentes, que germinam e crescem no produto final, ocasionando a sua deterioração durante o período de estocagem e, consequentemente, resultando em grandes perdas econômicas (Valík & Piecková, 2001; Enigl et al., 1993; Beuchat, 1986; Splittstoesser et al., 1972).

As espécies reportadas como deterioradoras de produtos a base de frutas são: *Byssochlamys nivea* e *Byssochlamys fulva*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp. (Valík & Piecková, 2001; Suresh et al., 1996; Tournas, 1994; Enigl et al., 1993; Quintavalla & Spotti, 1993; Hocking & Pitt, 1984; Van der Spuy et al., 1975). Os gêneros *Byssochlamys* sp. e *Neosartorya fischeri* são ainda relatados como produtores de micotoxinas (Tournas, 1994).

Atualmente, é reconhecida a distribuição mundial de fungos filamentosos termorresistentes e sua ocorrência tem sido frequentemente detectada em linhas de processamento de sucos. Muitos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de esclarecer suas fontes de contaminação, ocorrência, crescimento, deterioração, inativação e produção de toxinas (Slongo, 2004; Peña et al., 2004; Cunha, 2003; Salomão, 2002; Valík & Piecková, 2001; Rajashekhara et al., 1998; Ugwuanyi & Obeta, 1991; Aragão, 1989; Splittstoesser et al., 1972; Yates & Mooney, 1968).

Várias são as frutas e seus produtos envolvidos em deteriorações por fungos filamentosos termorresistentes, dentre elas pode-se citar: abacaxi, uva, morango, maracujá, manga, *grapefruit*, groselha, mamão, entre outras (Kotzekidou, 1997; Suresh et al., 1996; Tournas & Traxler, 1994; Splittstoesser et al., 1993; Ugwuanyi & Obeta, 1991).

A microbiologia preditiva se apresenta como uma ferramenta importante para avaliação do crescimento de fungos termorresistentes em diferentes produtos a base de frutas; sendo possível saber o quanto poderão interferir na vida de prateleira dos mesmos. Esta análise pode ser feita através de modelos matemáticos que descrevem o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições de temperatura, pH, atividade de água, entre outros fatores (Cheroutre-Vialeto et al., 1998; Whiting, 1995; Zwietering et al., 1991). Estes modelos podem prever a segurança microbiológica ou a vida de prateleira dos produtos sob condições comerciais, fundamentando-se na cinética de crescimento microbiano, para descobrir os pontos críticos do processo (Cheroutre-Vialeto et al., 1998; Giannuzzi et al., 1998; Labuza & Fu, 1993; Van Impe et al., 1992; Zwietering et al., 1991). O uso destes modelos preditivos pode reduzir a necessidade de análises laboratoriais dispendiosas (Davey, 1994).

Este trabalho, que faz parte do Projeto EMBRAPA (Prodetab) UNICAMP/UFSC “Melhoria da qualidade de sucos mediante o uso de alta pressão e controle microbiológico”, teve como objetivo, primeiramente, escolher uma medida de crescimento que fosse válida para expressar o crescimento de fungos. Foram testados três métodos: medida de absorbância, filtração e medida de diâmetro da colônia, para estabelecer o melhor método e utilizá-lo nos ensaios. Como a medida de diâmetro foi o método mais reprodutível, foi feito um estudo da influência da temperatura de estocagem no crescimento de *Byssoschlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*. A partir destes dados, foi realizada a modelagem secundária (Modelo da Raiz Quadrada) da temperatura de estocagem em função dos parâmetros de crescimento (duração da fase de adaptação (λ), a

velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e o diâmetro máximo atingido pela colônia (A)).

Por fim, foi estudado o crescimento de *Neosartorya fischeri* e *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi e em suco de mamão, em função do tempo, dentro de um planejamento experimental exploratório 2^4 fatorial fracionário, para analisar o efeito dos seguintes fatores: temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento do fungo, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa. Os dados de crescimento foram ajustados a dois modelos primários (Gompertz Modificado e Logístico). O efeito dos fatores foi avaliado por análise de variância ($p < 0,05$).

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste Capítulo, primeiramente, é apresentada uma revisão sobre fungos filamentosos termorresistentes, incluindo as principais espécies, as enzimas e micotoxinas por eles produzidas, a ocorrência destes em alimentos e os fatores que afetam o seu crescimento. Em seguida, é apresentada uma revisão sobre microbiologia preditiva, que é uma ferramenta importante para a avaliação do crescimento destes fungos em diferentes produtos.

1. FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

A maioria dos fungos filamentosos possui limitada resistência térmica e é facilmente destruída pelo calor. Os esporos sexuais (conídios) dos gêneros mais comuns como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, entre outros, são mortos depois de 5 minutos de aquecimento a 60°C. Entretanto, algumas espécies que apresentam característica de produzir ascósporos demonstram uma alta resistência térmica (Hocking & Pitt, 1984; Tournas, 1994).

1.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS (SUB-REINO ASCOMICETO)

A principal característica dos fungos termorresistentes é a formação de ascósporos (esporos produzidos pelos representantes do sub-reino Ascomycota) muito resistentes. O tamanho, forma e ornamentação destes ascósporos variam com o tipo, espécie e linhagem do microrganismo, bem como com as condições dos meios sob os quais os esporos são formados (Pitt & Hocking, 1985).

Outra característica destes fungos é a formação do asco, que é uma estrutura em forma de saco ou bolsa, no interior da qual são produzidos oito ascósporos de forma e cor variados para cada espécie. Quando amadurecem, os ascos sofrem uma ruptura por onde são liberados os ascósporos. Estes possuem parede e são, geralmente, ornamentados e refrateis. Os ascos de alguns destes fungos são recobertos por um grande corpo de frutificação que leva o nome geral de ascocarpo. As espécies termorresistentes, usualmente, produzem dois tipos diferentes de ascocarpo: o cleistotécio (membrana rígida, esférica, de parede lisa e completamente fechada) ou o gimnotécio (parede formada por um emaranhado de hifas). Algumas espécies podem ainda produzir ascos sem ascocarpo, como é o caso do gênero *Byssosclamyces* (Pitt & Hocking, 1985).

Samson & Van Reenen Hoekstra (1988) relataram que o estado formador de ascos, conhecido como estado teleomórfico, vem sempre acompanhado de um ou mais estados

assexuados que são denominados anamórficos. A maioria dos Deuteromicetos (fungos imperfeitos) é o ciclo de vida anamórfico dos Ascomicetos.

Os fungos filamentosos termorresistentes mais comumente estudados pertencem aos gêneros *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*. Eles têm sido reportados devido às suas habilidades em sobreviver às temperaturas normalmente empregadas nos tratamentos de pasteurização fornecidos a alimentos ácidos, como frutas e seus derivados (Enigl et al., 1993; Tournas, 1994; Splittstoesser et al., 1970; Hocking & Pitt, 1984). Devido a esta resistência, podem crescer e contaminar os produtos durante a estocagem à temperatura ambiente, o que decorre em grandes perdas econômicas. Estes organismos são saprófitas, mais preferencialmente que parasitas, e usualmente contaminam frutas que são cultivadas próximas da terra (Tournas, 1994).

1.2. PRINCIPAIS ESPÉCIES

Os gêneros mais termorresistentes reportados na literatura são: *Byssochlamys* e *Neosartorya* (Slongo & Aragão, 2006; Kotzekidou, 1997; Tournas & Traxler, 1994).

1.2.1. *Byssochlamys*

Este gênero é caracterizado pela ausência de cleistotécio, gimnotécio ou qualquer outra estrutura de proteção de seus ascos durante o desenvolvimento e maturação. Os ascos são produzidos em cachos irregulares, abertos, contendo oito ascósporos em associação com fragmentos de hifas, mas não envolvidos por elas (Beuchat & Rice, 1979). Os ascos permanecem inalterados a menos que sejam submetidos a um tratamento mecânico (Splittstoesser, 1991).

Os ascósporos são estruturas transparentes, habitualmente ovais e lisas, com dimensões que variam de 2,8-4,0 x 3,4-5,6 µm. As fases anamorfais ou imperfeitas do *B. fulva* e *B. nivea* são *Paecilomyces fulvus* e *Paecilomyces niveus*, respectivamente. As colônias de *B. nivea* geralmente são brancas em Ágar Extrato de Malte (MEA) ou Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA), sendo seus ascos de dimensões maiores que os de *B. fulva*. As colônias deste último são marrons amareladas nestes mesmos meios (Beuchat & Rice, 1979).

A temperatura ótima de crescimento de *Byssoschlamys nivea* está entre 30°C e 37°C (Tournas, 1994; Olliver & Rendle, 1934); sendo que nenhum crescimento foi observado a 8°C (Hull, 1939).

1.2.2. *Neosartorya fischeri*

Os fungos desta espécie apresentam ascos recobertos por cleistotécio, dando a colônia uma aparência granular. Estes ascos podem sofrer ruptura instantânea de modo que só os ascósporos livres são observados. A única espécie deterioradora de alimentos reportada é a *Neosartorya fischeri*, que possui três variedades: *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. fischeri* var. *glabra* e *N. fischeri* var. *spinosa*, sendo cada uma distinta na ornamentação de seus ascósporos, tipos de toxinas e metabólitos secundários produzidos. Somente as variedades *glabra* e *spinosa* têm sido isoladas de produtos processados a base de frutas, enquanto que a *fischeri* é predominante no solo (Kavanagh et al., 1963; Ugwuanyi & Obeta, 1991; Nielsen, 1991).

Os ascos são biconvexos com divisão equatorial e extremamente resistentes. Na variedade *glabra*, a superfície dos ascósporos apresenta-se lisa e na variedade *spinosa*, a mesma é espinhosa; enquanto que a variedade *fischeri* possui ascósporos com superfície granular (Nielsen, 1991).

As colônias em MEA são brancas-creme e o reverso varia de amarelo a rosa pálido ou marrom. O micélio é branco e há grande produção de cleistotécio. Os ascósporos são elipsoidais ou ovais, de 7 a 8 µm de comprimento e apresentam duas cristas longitudinais. A fase anamorfa é conhecida por *Aspergillus fischeri*, entretanto o estado teleomórfico é o mais encontrado (Hocking & Pitt, 1984; Tournas, 1994).

De acordo com Nielsen et al. (1989), o fungo *Neosartorya fischeri* cresce em uma faixa de temperatura de 10°C a 52°C, sendo de 26°C a 45°C sua faixa ótima. Tournas (1989) reportou que a temperatura ótima de crescimento está entre 30°C e 36°C; não havendo crescimento a 10°C.

Segundo Jasenka et al. (1991), este fungo pode sobreviver a temperaturas de 70°C por 120 minutos e 85°C por 60 minutos. De acordo com Pitt & Hocking (1985), seus ascósporos podem sobreviver a tratamentos de 100°C por 12 minutos. Baglioni (1998) relatou que a *Neosartorya fischeri* suportou um aquecimento de 100°C por 25 minutos. O autor também observou que este fungo é uma das espécies com maior capacidade de elevar o pH do produto, o que levaria à germinação e a produção de toxinas por *Clostridium botulinum* nas proximidades ou abaixo do

crescimento micelial. Contaminações como estas podem causar alterações organolépticas no produto, favorecendo o desenvolvimento de outros microrganismos pelo aumento do pH, causando um fenômeno conhecido como *metabiosis*, também constatado por Gomez et al. (1989).

1.3. PRODUÇÃO DE METABÓLITOS

1.3.1. Produção de Enzimas

Os fungos filamentosos termorresistentes produzem várias enzimas, sendo as pectinases, amilases e proteinases as mais abundantes. As enzimas pectinolíticas são responsáveis pela hidrólise da pectina, e consequentemente pelo amolecimento das frutas (Tournas, 1994). Olliver & Rendle (1934) foram os primeiros a relatar a produção de enzimas pectinolíticas por *Byssochlamys*.

O crescimento de *B. fulva* em pêssegos enlatados foi estudado por Rice et al. (1977). Os autores verificaram que estes fungos excretaram enzimas pécticas após 16 dias de incubação a 30°C. Primeiramente, ocorreu um aumento da pectina solúvel em água, seguido por um decréscimo da mesma. Pouco crescimento foi observado durante a primeira fase de mudança na concentração da pectina, enquanto que as mudanças na textura já puderam ser notadas rapidamente. A alteração provocada por *B. fulva* é influenciada pelo grau de maturidade e pela variedade da fruta; sendo o crescimento mais rápido em frutas maduras com baixa acidez e alto teor de sólidos solúveis.

Yates & Mooney (1968) reportaram as condições requeridas para a produção de enzimas pécticas por *B. nivea*. Os autores verificaram que a produção máxima de enzimas foi obtida em meio contendo glicose e pectina e ocorreu após cinco dias de incubação a 35°C. Foi verificado ainda, que um aumento na produção de enzima gerou uma diminuição na concentração de pectina.

Ugwuanyi & Obeta (1999) relataram a atividade de enzimas pectinolíticas e celulolíticas produzidas por *Neosartorya* sp., *B. nivea* e *Paecilomyces variotti* em dois meios artificiais; um contendo pectina e outro contendo tecido de manga. Os autores também avaliaram o efeito da desintegração, causada por essas enzimas, em meios artificiais contendo tecidos de manga. Os três isolados produziram atividades consideráveis de hidrolase, liase e pectinase nos meios estudados. Para o *B. nivea*, também foi verificada uma grande atividade de celulase. Foi observado que os isolados causaram considerável desintegração dos meios. Por fim, o trabalho sugere que possa

haver uma possível cooperação entre a pectinase e a celulase na desintegração do tecido de fruta estudado.

1.3.2. Produção de Micotoxinas

Os fungos são indesejáveis nos alimentos por produzirem uma variedade grande de enzimas que provocam a deterioração dos mesmos. Além disso, os fungos podem produzir metabólitos secundários tóxicos quando estão se multiplicando. Estes metabólitos são denominados “micotoxinas” e, quando ingeridos, causam alterações biológicas prejudiciais tanto ao homem quanto aos animais.

Algumas linhagens de *Neosartorya fischeri* são capazes de produzir toxinas como as fumitremorginas (A, B, C), verruculogena, fischerina e terreina (Tournas, 1994; Misawa et al., 1962; Hoire & Yamazaki, 1981; Patterson et al., 1981). Estes compostos são capazes de atuar no sistema nervoso central e causar tremores, convulsões e morte em animais (Tournas, 1994; Perera et al., 1982; Yamazaki et al., 1971; Yamazaki et al., 1979). A verruculogena é a mais tóxica, causando tremores em suínos e ovelhas em concentração de 5 a 10 mg/Kg de peso corporal, administrado por meio intravenal (Perera et al., 1982).

Em estudo realizado para verificar a produção de micotoxinas por *N. fischeri* em vários meios, Nielsen et al. (1988) observaram que a adição de glicose, frutose ou sacarose aumentava a produção de fumitremorgina. A verruculogena foi produzida em todos os meios testados, em maior quantidade que as demais, seguida de fumitremorgina A e C. Os autores também estudaram as temperaturas ótimas para produção de verruculogena e fumitremorginas A e C, em Ágar Czapeck Extrato de Levedura (CYA) a pH 7,0. Os valores encontrados foram 25°C, 30°C e 37°C, respectivamente. A produção de fumitremorgina foi retardada à temperatura de 15°C, mas aumentando o período de incubação, observou-se uma concentração aproximadamente igual à observada a 25°C. O uso de luz aumentou a produção de fumitremorgina (CYA, pH 3,5, 25°C), mas não tão acentuadamente como quando foi adicionada glicose, frutose ou sacarose ao meio (CYA, pH 3,5, 25°C). A produção desta micotoxina foi maior à atividade de água de 0,98 em CYA suplementado com glicose ou frutose e à atividade de 0,99 em CYA suplementado com sacarose. A produção de fumitremorgina foi observada em atividades de água tão baixas quanto 0,925 em

CYA suplementado com glicose, mas não em atividades de água menores que 0,97 em CYA suplementado com sacarose.

A patulina, considerada tóxica para microrganismos, plantas e animais e extremamente nociva à saúde humana, é uma micotoxina produzida por espécies do gênero *Aspergillus* (*A. clavatus*, *A. terreus*), *Penicillium* (*P. urticae*, *P. expansum*) e *Byssochlamys* (*B. nivea* e *B. fulva*); sendo que estes últimos têm demonstrado alto potencial para a produção da mesma (Rice et al., 1977; Tournas, 1994).

Em estudo realizado para verificar a presença de patulina, Burda (1999) analisou 328 maçãs, pêras e produtos com misturas de frutas incluindo sucos, molhos, purês e geléias e polpas de maçãs de 38 produtores australianos. Em 75 das 258 amostras de sucos e concentrados foi detectada a presença de patulina entre 5 e 50 µg/L e em 73 amostras foi verificada uma concentração de toxina entre 51 e 1130 µg/L. Dentre 70 amostras, que não são sucos, houve detecção de patulina em 18; sendo que os níveis detectados se mostraram inferiores a 50 µg/Kg.

A patulina é um contaminante comum de maçãs maduras que são utilizadas na fabricação de sucos e concentrados. Ela é encontrada naturalmente em maçãs apodrecidas, que podem conter níveis de 1120 a 6235 ng/g. Quando as maçãs são e podres são processadas juntas, a toxina pode ser transferida para o suco ou concentrado através da solubilização em água. Pelo fato do meio possuir essência ácida, a patulina não pode ser degradada pelo processamento térmico (Sydenham et al., 1997).

Scott & Somers (1968) estudaram a estabilidade térmica da patulina em diferentes sucos. Os autores utilizaram temperaturas que variavam de 22°C a 80°C e constataram que, utilizando concentrações iniciais de 4 mg/mL, após tratamento térmico de 80°C por 10 e 20 minutos, uma concentração de 50% e 45% em comparação a concentração inicial ainda permaneceram no suco, respectivamente. Lovett & Peeler (1973) constataram que a patulina possui um comportamento estável quando aquecida a 100°C por 15 minutos e, posteriormente, torna-se mais resistente em uma faixa de pH de 3,5 e 5,5.

Leggott & Shephard (2001) reportaram que o controle da patulina em sucos e derivados de frutas pode ser obtido utilizando-se matéria prima de boa qualidade e estocagem em atmosfera controlada. Devem ser retiradas as frutas rompidas ou danificadas e os tecidos rompidos. Também pode ser utilizada filtração com carvão ativado, fermentação do suco de maçã, adição de dióxido sulfúrico, adição de ácido ascórbico, irradiação e pasteurização.

Frisvad & Samson (1991) demonstraram que já foram identificados mais de 400 tipos de micotoxinas diferentes, sendo as de maior relevância aquelas encontradas no suco de uva. Este suco, assim como os demais, é passível de contaminação por fungos termorresistentes, sendo que, para o suco de uva, o gênero *Byssochlamys* é o de maior interesse na produção de micotoxinas (Beuchat & Rice, 1979). Este gênero, além da patulina, é ainda capaz de produzir outras toxinas como o ácido byssoclâmico, a byssotoxina A, a assimetrina e a variotina (Beuchat & Rice, 1979; Tournas, 1994).

A presença de ácido byssoclâmico foi detectada, após armazenagem do produto contaminado por um e dois meses. A capacidade de formação deste ácido é aumentada pela adição de compostos como sacarose, galactose, ácido cítrico, maltose, frutose, ácido glucônico e glicerol ao meio (Tournas, 1994).

1.4. ALIMENTOS SUSCEPTÍVEIS À CONTAMINAÇÃO

Os alimentos susceptíveis à deterioração por fungos termorresistentes são as frutas e produtos a base de frutas, como sucos, polpas, concentrados e frutas enlatadas. A contaminação por estes fungos geralmente ocorre na parte superior da embalagem de produtos enlatados ou cartonados. As frutas que são colhidas diretamente do solo ou que estão próximas dele, como morango, ameixa, maracujá, uva, abacaxi, pêssego, mamão papaia, tomate e maçã são as mais afetadas pela deterioração por fungos termorresistentes (Tournas, 1994).

A partir do início dos anos 90, ocorreu um aumento no volume e na variedade de produtos a base de frutas no mercado. Novos processos de fabricação, embalagem e tecnologia de preservação, bem como, um aumento na demanda de consumo têm causado um incremento na quantidade e variedade de sucos de frutas no mercado. Os métodos mais frequentes de preservação para estes produtos são a pasteurização e o processo de ultra-alta temperatura (UHT), sendo pouco frequentes o uso de conservantes químicos (Tournas, 1994).

A presença de fungos termorresistentes nas frutas é influenciada pela amplitude da exposição ao solo, bem como pela prevalência do fungo no solo onde as frutas são cultivadas (Beuchat & Rice, 1979). Algumas linhagens de *Byssochlamys* e *Neosartorya fischeri* têm se tornado um problema industrial, devido à deterioração dos produtos e a produção de micotoxinas (Rice et al., 1977; Patterson et al., 1981).

O gênero *Byssochlamys*, por ser abundante no solo, facilmente contaminaria frutas como morango, ameixa, maçãs, groselha, entre outras, especialmente as colhidas junto ao mesmo (Olliver & Rendle, 1934).

Na Austrália, a deterioração de alimentos por *Byssochlamys* foi reconhecida nos anos 60 em morangos enlatados. Nos Estados Unidos, a contaminação pelo mesmo fungo foi reportada em 1967, sendo este isolado de bebida de fruta enlatada. Na Holanda, a contaminação em morangos inicialmente foi detectada por *B. fulva* e secundariamente por *B. nivea* (Tournas, 1994).

Maunder (1969) estudou a contaminação causada por espécies de *Byssochlamys*, em sucos e bebidas de frutas a base de uva e maçã, concentrado de abacaxi, polpas de frutas, além de recheio para torta de amora e cereja e enlatados de amora e morango. *Paecilomyces* (forma anamorfa do gênero *Byssochlamys*) foi isolado de concentrado de uva, suco de maçã, figos enlatados e recheio de amora. Yates (1974) isolou *Byssochlamys* sp. de suco de uva enlatado e concentrado de uva.

O gênero *N. fischeri* foi inicialmente detectado em morangos enlatados por Kavanagh et al. (1963). McEvoy & Stuart (1970) citaram que latas de morangos na Irlanda também tiveram problemas com *N. fischeri* entre 1958 e 1968. Splittstoesser & Splittstoesser (1977) estudaram o gênero *Neosartorya* isolado de bebida de fruta contaminada.

Na Austrália, Hocking & Pitt (1984) reportaram que *N. fischeri* foi o agente contaminante em suco de maracujá. Os autores verificaram ainda que as matérias primas cruas mais prováveis de contaminação com esporos de fungos termorresistentes são maracujá e morango. Sucos e polpas de abacaxi e manga também podem ser fontes de contaminação; enquanto laranja e outras frutas cítricas são menos implicadas. Como o maracujá é usualmente colhido depois de cair no chão, existe uma susceptibilidade maior de contaminação no mesmo. Morangos e abacaxis podem ser contaminados através dos respingos de água durante as chuvas, por serem cultivados junto ao solo.

Jasenka et al. (1991) constataram o recebimento de conservas deterioradas por fungos provindos de uma planta de processamento. As cepas identificadas foram: *N. fischeri* (49,2%), *B. nivea* (16,4%) e *T. flavus* (20,9%).

No Brasil, Aragão (1989) isolou 58 culturas de fungos filamentosos termorresistentes a partir de 15 amostras de polpa de morango, sendo que, dentre os gêneros isolados, foram encontrados: *B. nivea*, *N. fischeri*, *T. flavus* var. *flavus* e *Eupenicillium javanicum* var. *javanicum*.

Baglioni (1998) estudou a ocorrência de fungos termorresistentes durante o processamento asséptico de polpa de tomate. O autor encontrou cinquenta linhagens, sendo que o isolado mais

termorresistente, identificado como *N. fischeri*, sobreviveu ao choque térmico de 100°C por 25 minutos. O autor também constatou que a maior contaminação por *N. fischeri* na linha de processamento se deu na matéria prima e na água de transporte e de pré-lavagem. Concluiu que o aparecimento deste fungo ocorreu devido à falta de matéria prima de boa qualidade, sanificação e condições assépticas das áreas de processamento e embalagens e procedimentos adequados de higienização.

Ainda no Brasil, Salomão (2002) isolou onze cepas de fungos termorresistentes de néctar de maçã, nove cepas de polpas comerciais congeladas de morango e uva e uma cepa, identificada como *B. fulva*, de suco de morango comercial pasteurizado e preservado com benzoato de sódio e sorbato de potássio; demonstrando assim a resistência termoquímica que este microrganismo apresenta. As cepas isoladas foram identificadas como: *N. fischeri*, *B. fulva*, *Talaromyces* sp., *Eupenicillium* sp. e *Aspergillus* sp.

Ugwuanyi & Obeta (1991) analisaram vinte amostras frescas de manga que foram colhidas em Nsukka, na Nigéria. Das amostras examinadas, três estavam contaminadas por fungos termorresistentes, sendo todos descritos como *Neosartorya* sp.

Vinte culturas de fungos filamentosos termorresistentes foram isoladas de pasta de tomate enlatada, com o objetivo de estimar a eficiência da pasteurização aplicada a produtos enlatados comerciais. Dentre as cepas isoladas, foram identificados ascósporos de nove linhagens, sendo três de *B. fulva*, duas de *B. nivea* e quatro de *N. fischeri* (Kotzekidou, 1997).

Vários outros trabalhos demonstraram a contaminação de produtos comerciais por fungos termorresistentes. O gênero *Byssoschlamys* já foi isolado de *drink* de uva termicamente processado (Splittstoesser et al., 1969), de suco de maçã (Van der Riet & Van der Walt, 1985) e de suco de fruta concentrado a 50°Brix (Palou et al., 1998).

Além de produtos de frutas, poucos são os relatos que denotam a presença de fungos filamentosos termorresistentes em outros tipos de produtos.

1.5. PRODUÇÃO E COLETA DOS ASCÓSPOROS

A produção de ascósporos é uma característica dos fungos filamentosos termorresistentes. O tamanho, forma e ornamentação dos mesmos variam com o tipo, espécie, cepa e condições do meio onde foram formados. A produção e ativação destes ascósporos são dependentes tanto de

fatores genéticos, como a linhagem do microrganismo, quanto de fatores externos como tempo, temperatura, meio de crescimento e/ou aquecimento (Tournas, 1994).

Ao estudar a esporulação de um isolado de *Byssoschlamys* encontrado em bebida de fruta, Splittstoesser et al. (1969) reportaram que este fungo formou muito poucos ascósporos em laboratório. Ao investigar os fatores que afetaram a esporulação desta cepa, observou-se que a população máxima de ascos estava presente quando estes cresciam em caldo de extrato de malte a 5%, pH 2,0 e 3,0, por um período de 4 a 14 dias a 30°C. Diferentes sucos de frutas e vegetais foram testados como substratos para o crescimento deste fungo; os sucos de ameixa, uva e maçã propiciaram a maior produção de ascósporos seguidos pelos sucos de laranja, coquetel de vegetais e tomate. O suco de oxicoco resultou em um baixo rendimento de ascósporos.

Segundo Beuchat & Rice (1979), as temperaturas ótimas de incubação para o crescimento e produção de ascósporos de *Byssoschlamys* foram entre 28°C e 35°C; porém existem isolados que, se forem incubados abaixo de 30°C em meio sintético, perdem irreversivelmente a capacidade de formar ascos.

Engel & Teuber (1991) estudaram a influência da temperatura de incubação na produção de ascósporos de *B. nivea* em Ágar Extrato de Malte (MEA) por 21 dias. Os autores encontraram que nas temperaturas de 20°C e 37°C, a produção de ascósporos foi bem menor em relação à produção a 25°C e 30°C; obtendo-se em 30°C a maior quantidade de ascósporos.

Aragão (1989) produziu ascósporos de fungos termorresistentes em meio Ágar Batata Dextrose (PDA) e em meio MEA em garrafas inclinadas, com 4 a 6 semanas de incubação a 30°C. A coleta dos ascósporos da superfície foi realizada pela adição de pérolas de vidro e água estéril em cada garrafa e agitação manual. Após filtração, centrifugação e lavagem da suspensão resultante, o precipitado foi ressuspenso em água estéril para obtenção de uma contagem final de 10^6 a 10^7 ascósporos/mL. A centrifugação foi suficiente para liberar os ascósporos dos ascos para todos os fungos estudados; exceto para *B. nivea*. Este foi submetido a vários procedimentos para liberação dos ascósporos, porém sem sucesso; demonstrando a alta resistência dos ascos deste fungo.

Baglioni (1998) utilizou meio MEA para a produção de ascósporos, em garrafas de Roux, de fungos isolados no processamento asséptico de polpa de tomate. Para a coleta dos ascósporos, utilizou uma bagueta de vidro estéril com a qual executou a raspagem do micélio formado. A

suspensão resultante foi centrifugada três vezes para a limpeza a 10000 rpm por 15 minutos a 5°C e ressuspendida em água estéril para a obtenção de uma concentração de 10^6 a 10^7 ascósporos/mL.

O meio PDA foi utilizado por Rajashekhara et al. (1996) e Suresh et al. (1996) para a produção de ascósporos de *N. fischeri* isolados, respectivamente, de mamão e uva. A temperatura e o tempo de incubação utilizados em ambos os trabalhos foi 30°C por 30 dias. Após a obtenção das suspensões de ascósporos, tais autores congelaram-nas até utilização.

Samson & Van Reenen-Hoekstra (1988) reportaram que o meio MEA tem maior capacidade de produção de esporos em comparação com outros meios, pelo fato desse ser mais rico em nutrientes.

1.6. ATIVAÇÃO DOS ASCÓSPOROS

A partir do momento que os ascósporos de fungos termorresistentes são formados, estes desenvolvem com o tempo uma dormência (estado de baixa atividade metabólica). Esta pode ser quebrada por um tratamento sub-letal, usualmente um choque térmico, chamado ativação. A ativação permite a germinação e o crescimento em condições favoráveis (Beuchat & Rice, 1979; Beuchat, 1986; Splittstoesser et al., 1993).

Gottlieb (1964) disse que germinação é o processo pelo qual o esporo é transformado de um estágio de dormência para um estado de alta atividade metabólica. Esta alta atividade é refletida na ativação de processos produtores da energia necessária na síntese de proteínas e subsequente formação do microrganismo. A ativação do processo produtor de energia, caracterizado por altas taxas de respiração, pode ser iniciada por um choque térmico, por aplicações de compostos químicos, presença e ausência de luz, entre outros.

Os tratamentos de ativação sugeridos na literatura variam com o tempo, a temperatura e o meio de aquecimento. Beuchat (1986) reportou que as linhagens de *B. nivea* necessitaram de 70°C a 75°C por 30 minutos para ativação e as linhagens de *N. fischeri*, que são mais termorresistentes, apresentaram uma ativação ótima a 85°C por 15 minutos. Splittstoesser et al. (1993) avaliaram a relação entre a taxa de ativação e o meio de aquecimento. Os autores concluíram que a taxa de ativação de ascósporos de *N. fischeri* era maior em suco de uva a 5°Brix do que em água destilada. Kotzeikidou (1997), estudando também a ativação de *N. fischeri*, concluiu que esta era maior em suco de tomate (16% sólidos solúveis, pH 4,2) do que em solução de tampão fosfato (0,1M, pH 7).

Rajashekhara et al. (1996), após testar tratamentos a 70°C, 75°C, 80°C, 85°C e 90°C para a ativação de ascósporos de *N. fischeri*, encontraram o binômio tempo-temperatura de 80°C por 30 minutos. O meio de aquecimento utilizado no estudo foi tampão fosfato (0,1M, pH 7) e o meio para recuperação dos ascósporos foi PDA. Neste mesmo ano, Suresh et al. (1996) encontraram que o tempo de ativação para ascósporos de *N. fischeri* foi de 15 a 60 minutos na temperatura de 75°C e 15 minutos a 80°C.

Rajashekhara et al. (2000) realizaram um estudo com suco de uva e suco de manga, comparando as temperaturas de ativação de esporos termorresistentes de *N. fischeri*. Os autores observaram que, utilizando inóculos de 10^4 ascósporos/mL, os ascósporos de *N. fischeri* sobreviviam por mais de 300 minutos quando expostos às temperaturas de 70°C, 75°C e 80°C.

Realizando ensaios com o objetivo de verificar os tempos ótimos de ativação para ascósporos de *N. fischeri*, com diferentes idades e utilizando água destilada como meio de aquecimento, Delgado (2001) encontrou que para aqueles com um mês de idade, o tempo ótimo obtido foi de 5 minutos a 80°C e para os de quatro meses de idade, a melhor recuperação ocorreu a 85°C por 20 minutos.

Mais recentemente, Slongo & Aragão (2006), estudando a influência do meio de aquecimento, temperatura de produção e idade dos ascósporos na ativação de esporos de *N. fischeri*, reportaram que os menores tempos de ativação (85°C/5' para suco de abacaxi e 85°C/10' para suco de mamão) foram observados com os mesmos produzidos a 25°C e 1 mês de idade, sendo o *ratio* do meio de aquecimento 10 para suco de abacaxi e 26 para suco de mamão. Entretanto, quando os ascósporos foram produzidos a 35°C por 3 meses e aquecidos em meio com *ratio* 38 para suco de abacaxi e 66 para suco de mamão, foram necessários 15 minutos a 85°C para ativá-los em suco de abacaxi e 20 minutos a mesma temperatura para ativá-los em suco de mamão.

1.7. FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

A conservação dos produtos à base de frutas baseia-se principalmente no uso de processamento térmico e na utilização de conservantes químicos. Como a deterioração destes produtos é devido à ação microbiológica, o tratamento térmico, pasteurização e/ou esterilização, dado ao produto deve ser adequado para a destruição da maioria dos contaminantes, sejam eles

bactérias, fungos filamentosos ou fungos filamentosos termorresistentes; contudo o tratamento não deve diminuir a qualidade do produto processado. Caso isto não seja possível, medidas alternativas, com a finalidade de prevenir o desenvolvimento destes microrganismos e a deterioração provocada por eles, devem ser aplicadas. Em geral, o tempo e a temperatura aplicados são suficientes para destruição das bactérias e fungos filamentosos, porém deixa a desejar em termos de fungos termorresistentes (Tournas, 1994).

Vários são os fatores que contribuem para a sobrevivência e crescimento de fungos termorresistentes em alimentos, dentre eles o mais importante é a contaminação inicial, que deve ser rigorosamente controlada. Outros fatores importantes são: atividade de água (a_w), pH, presença de ácidos orgânicos, tipos de meio de aquecimento, adição de conservantes, potencial de oxido-redução, conteúdo de nutrientes, tempo e temperatura de produção dos ascósporos, atmosfera (O_2 , CO_2 , N_2), a tensão de oxigênio na embalagem e a temperatura de estocagem dos produtos. Estes fatores também devem ser controlados (Tournas, 1994; Jay, 1992).

Se o grau de contaminação inicial for baixo, um tratamento térmico mais ameno reduzirá o número de unidades formadoras de colônia a níveis aceitáveis; porém se a contaminação inicial for alta, serão necessários tempos mais longos e temperaturas mais elevadas de processamento para que o produto alcance o mesmo nível de esterilidade. Contudo, aquecimentos excessivos alteram as características organolépticas e a qualidade nutricional do produto (Tournas, 1994).

1.7.1. Boas Práticas de Fabricação (BPF)

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são sistemas de qualidade que asseguram que os produtos sejam produzidos e controlados com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. Como os fungos termorresistentes são provenientes do solo, podendo contaminar frutas e, posteriormente, linhas de processamento, esse controle de qualidade se torna imprescindível para a obtenção de produtos seguros (Slongo, 2004).

Em linha de processamento de sucos, as Boas Práticas de Fabricação consistem em verificar os critérios adequados de lavagem para remoção das sujidades das frutas, utilizar 100 mL/L de cloro para lavagem das frutas lisas; utilizar um transporte adequado para que não haja risco de rompimento; realizar a lavagem e sanificação adequada das caixas utilizadas no transporte

das frutas; evitar o contato dos equipamentos da planta com terra ou poeira; remover resíduos provenientes da matéria prima antes da mesma chegar à linha de produção; e por fim, a água de lavagem das frutas deverá ser sempre desprezada (Gressoni, 2002).

1.7.2. Temperatura de Estocagem dos Alimentos

A temperatura é um dos fatores extrínsecos mais importantes no controle do crescimento de microrganismos. No entanto, para a destruição dos ascósporos seria necessário um tratamento térmico tão severo que comprometeria a textura, as características organolépticas, nutricionais e a qualidade do produto, portanto, outros fatores devem ser manipulados para controlar o crescimento dos fungos termorresistentes (Tournas, 1994).

O efeito da temperatura de estocagem foi o primeiro parâmetro estudado na tentativa de prevenir a deterioração das frutas processadas. Olliver & Rendle (1934) reportaram que a temperatura ótima para crescimento de *Byssochlamys* estava entre 30°C e 37°C, e que ao estocar o produto na faixa entre -12°C e -7°C, o crescimento era inibido; não significando, no entanto, a morte do microrganismo. Beuchat & Toledo (1977), ao estudarem sucos e néctares de frutas estocados a 7°C, mostraram que não houve crescimento de *B. nivea*. Também reportaram que a estocagem de ascósporos na faixa entre 7°C e -30°C teve um efeito letal. Entretanto, ao adicionar açúcar nos produtos, observou-se um efeito protetor.

Segundo Nielsen et al. (1988), *N. fischeri* cresceu entre 10°C e 52°C, com uma temperatura ótima entre 26°C e 45°C. Tournas (1994) reportou que o crescimento ótimo e a formação de ascósporos de *N. fischeri* ATCC 66781 ocorreram entre 30°C e 36°C e não foi observado crescimento a 10°C e a temperaturas inferiores. O estudo foi realizado em meio CYA.

Estudando a vida de prateleira de recheios de frutas inoculados com suspensões de *T. flavus* e *N. fischeri*, Beuchat (1986) reportou que colônias de ambos os fungos se desenvolveram em todos os produtos estocados a 25°C por três dias. Colônias visíveis de *T. flavus* apareceram nos recheios de frutas entre 28 e 32 dias após a incubação a 10°C. Já os produtos inoculados com *N. fischeri*, mostraram crescimento visível do fungo somente após 65 dias de incubação a 10°C.

Para selecionar uma temperatura de refrigeração para controle da deterioração causada por fungos termorresistentes, deve-se levar em conta alguns fatores como a vida de prateleira requerida para o produto e os custos referentes à estocagem nesta temperatura (Beuchat, 1986).

Estes resultados indicam que o crescimento de *Byssochlamys* e *Neosartorya* pode ser controlado estocando os produtos em temperaturas reduzidas; mesmo que a inativação dos ascósporos não possa ser assegurada (Tournas, 1994).

1.7.3. Atividade de Água ou Teor de Sólidos Solúveis do Produto

Para a sobrevivência e multiplicação, os microrganismos necessitam de água, na forma livre. A atividade de água mínima necessária varia para cada microrganismo e ela é influenciada por fatores do meio que a compõem. Beuchat & Toledo (1977) encontraram que a atividade de água mínima para a germinação de *Byssochlamys* é de 0,84 e Baglioni (1998) encontrou que, para *Neosartorya fischeri*, a atividade de água mínima é de 0,915.

Beuchat & Toledo (1977) estudaram a influência da atividade de água sobre o crescimento de *B. nivea* em sucos e néctares de frutas suplementados com diferentes concentrações de sacarose. A menor atividade de água para crescimento de *B. nivea* foi de 0,90 em néctar de pêssego e suco de ameixa seca adicionado de 40% de sacarose. Um dos testes realizados neste trabalho foi obtido adicionando sacarose em ágar suco de uva nas concentrações de 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 60% e distribuindo o meio resultante em Placas de Petri. Após a solidificação do meio, foi adicionado 0,1 mL da suspensão de ascósporos na superfície da placa. Esta foi incubada a 30°C em plásticos fechados. Observou-se que o número de colônias obtidas manteve-se praticamente o mesmo até o fim do período de incubação, nos meios com até 30% de adição de sacarose. Com 40% de sacarose, houve uma redução de 80% na formação das colônias e, com 60%, não foi detectado nenhum crescimento de colônia até o final do período de incubação. Ainda neste trabalho, foi verificado o número de dias necessário para o aparecimento de colônias de *B. nivea*, após inoculação de seus ascósporos nos sucos adicionados de diferentes quantidades de sacarose e estocados às temperaturas de -30°C, 7°C, 21°C e 30°C. A germinação dos ascósporos ocorreu mais rapidamente a 30°C do que a 21°C. Para a estocagem a -30°C e 7°C, nenhum crescimento foi observado em um período de 12 semanas (tempo total do teste).

Para não haver germinação dos ascósporos sobreviventes da pasteurização, produtos com alta atividade de água devem ser estocados a baixas temperaturas. A diminuição da temperatura de armazenamento e da atividade de água simultaneamente, exerce uma ação sinérgica na conservação de alimentos termoprocessados (Beuchat & Toledo, 1977; Nielsen et al., 1988).

Em 1992, Beuchat estudou a sobrevivência de ascósporos de *N. fischeri* e *T. flavus* em frutas em pó (maçã, mirtilo, uva, abacaxi e morango). A atividade de água das frutas era 0,23. O fungo, adicionado ao produto seco, foi incubado à temperatura de 25°C em local lacrado, por um período de até 8, 17 e 30 dias. Vencido cada período de estocagem, as amostras eram submetidas a tratamento térmico de 75°C por 15 e 30 minutos e o número de viáveis contado. Como resultado obteve-se que ambos os fungos mantiveram alta viabilidade mesmo após 30 dias de estocagem. Os ascósporos de *N. fischeri* se mantiveram ativados durante o tratamento de secagem, usado para a preparação do inóculo e, quando estocado nas frutas secas, não requereram ativação térmica para a germinação. Por outro lado, os ascósporos de *T. flavus*, similarmente preparados e estocados, necessitaram de ativação térmica para uma contagem máxima das colônias; indicando que seus ascósporos permaneceram em estado de dormência durante a estocagem.

Obeta & Ugwuanyi (1997) avaliaram o crescimento de *Neosartorya* sp. em ágar contendo sucos de frutas nigerianos (ágar suco de manga, ágar suco de laranja e ágar suco de abacaxi) contendo vários níveis de açúcar adicionado. A adição de sacarose nas concentrações de 10% para o suco de abacaxi, 11,5% para o suco de laranja e 9% para o suco de manga aumentou o número de colônias; entretanto a adição de sacarose nas concentrações iguais ou acima de 30% para suco de abacaxi, 31,5% para suco de laranja e 29% para suco de manga diminuíram o número de colônias produzidas.

Segundo Beuchat & Rice (1979), mesmo que a baixa atividade de água em concentrados de frutas aumente a preservação destes produtos, este fator não deve ser utilizado no controle da deterioração por fungos termorresistentes em latas de frutas processadas, pois as concentrações de sacarose se encontram em uma faixa que permite a germinação de ascósporos e crescimento de *Byssoschlamys*.

Tournas & Traxler (1994) estudaram os ascósporos de *N. fischeri* para comparar as resistências térmicas obtidas em dois meios com diferentes porcentagens de sólidos solúveis. Os autores verificaram que, quando aquecidos a 85°C, 88°C, 90°C e 100°C por uma hora em suco de abacaxi concentrado (42,7°Brix), os ascósporos se mostraram mais termorresistentes que ao serem aquecidos em suco de abacaxi (12,6°Brix) ou em água deionizada estéril. Esse resultado indicou um efeito protetor devido à maior porcentagem de sólidos solúveis no meio. Resultados similares foram relatados por Rajashekhara et al. (1996), que estudaram ascósporos de *N. fischeri* e

utilizaram como meio de aquecimento sucos de manga e uva, contendo diferentes teores de sólidos solúveis (10°Brix e 45°Brix, para suco diluído e para suco concentrado, respectivamente).

Slongo (2004) estudou a influência do *ratio* do meio de aquecimento na resistência térmica de *N. fischeri* em suco de abacaxi e suco de mamão. Ao aumentar o *ratio*, a resistência térmica do fungo aumentou em 45% para suco de mamão e em 36% para suco de abacaxi. Este resultado evidenciou que a resistência aumentou com o aumento da concentração de sólidos solúveis.

1.7.4. pH ou Presença de Ácidos Orgânicos

Tournas (1989) reportou que espécies de *Byssoschlamys* cresceram em substratos com pH entre 2,0 e 9,0; enquanto que *N. fischeri* cresceu entre valores de pH de 3,0 e 7,95. Poucos são os trabalhos que trazem informações sobre a faixa de pH ou qual é o pH ótimo de crescimento de fungos termorresistentes, porém sabe-se que crescem muito bem em regiões de acidez. Dessa forma, a manipulação do pH para controle do crescimento seria impraticável, pois seriam necessários valores muito reduzidos; inadequados para produtos alimentícios (Tournas, 1994).

Yates et al. (1967) estudaram o efeito do pH do meio de aquecimento na porcentagem de germinação de ascósporos de *B. nivea*. O pH dos meios ficou entre 3,0 e 5,5 e, após o choque térmico (75°C/5'), verificou-se a germinação apenas na faixa de 4,0 a 4,5 e acima de pH 5,0.

De acordo com Slongo (2004), o efeito dos ácidos orgânicos sobre a tolerância de ascósporos de fungos termorresistentes depende principalmente do tipo de ácido e do pH do meio de aquecimento. Este autor observou uma diminuição da resistência térmica de *N. fischeri* em suco de abacaxi e em suco de mamão com a adição de ácido cítrico. Conner & Beuchat (1987) estudaram a inativação térmica de ascósporos de *N. fischeri* utilizando como meios de aquecimento soluções de ácido fumárico, cítrico, málico e tartárico (1% e 2%) a pH 2,5, 3,0 e 3,5. Os autores verificaram que ocorreu uma diminuição da resistência térmica dos ascósporos no meio com ácido fumárico e nos meios com os demais ácidos houve um pequeno aumento da mesma.

1.7.5. Tempo e Temperatura de Produção dos Ascósporos

Conner & Beuchat (1987) estudaram a influência de três diferentes meios (Ágar Acetato de Fowell, Ágar suco de uva e Ágar suco de maçã) na produção de ascósporos de duas linhagens de

N. fischeri a 30°C para posterior teste de resistência térmica. Os resultados demonstraram que não houve influência dos meios de produção na resistência térmica dos ascósporos. Em outro estudo realizado pelos autores, eles avaliaram a resistência térmica de *N. fischeri* utilizando diferentes tempos e temperaturas de produção. Os ascósporos foram coletados em intervalos de tempo durante 114 dias. As temperaturas de produção foram 18°C, 21°C, 25°C e 30°C e o meio de crescimento utilizado foi Ágar suco de uva. A resistência térmica foi testada em tratamentos de 70°C e 80°C, durante 30 e 60 minutos e o meio de aquecimento utilizado foi uma solução de tampão fosfato (pH 7,0). Os resultados mostraram uma maior dormência e um aumento da resistência térmica com o aumento do tempo de produção. No fim dos 114 dias, observou-se que um tratamento térmico de 85°C por 60 minutos não foi suficiente para inativar os ascósporos formados a 21°C, 25°C e 30°C.

Engel & Teuber (1991) estudaram a influência da temperatura de produção na resistência térmica de *B. nivea*. Os ascósporos foram produzidos 20°C, 25°C, 30°C e 37°C em meio Ágar Extrato de Malte por 21 dias. Os autores observaram que a produção a 30°C proporcionou a maior resistência térmica; contrastando com outros relatos da literatura que citam que as maiores temperaturas produzem esporos com a maior resistência.

Tournas & Traxler (1994) estudaram a influência da idade dos ascósporos de *N. fischeri* na sua resistência térmica. Os ascósporos foram incubados a 30°C durante 1, 2, 3 e 6 meses. Ao final de cada período de produção, realizou-se um tratamento térmico a 88°C por 1 hora em água deionizada. Como resultado obteve-se que o aumento do tempo de produção gerou um aumento da resistência térmica do fungo.

Slongo (2004) estudou a influência da temperatura e idade de produção dos ascósporos na resistência térmica de *N. fischeri* em suco de abacaxi e suco de mamão. A idade de produção exerceu influência no aumento da resistência térmica, pois os ascósporos com maior idade de produção (3 meses) mostraram-se mais termorresistentes que os ascósporos de menor idade (1 mês). Com relação à temperatura, o autor observou um expressivo aumento da resistência térmica quando a temperatura de produção passou de 25°C para 35°C; sendo o aumento de 22% para suco de mamão e 19% para o suco de abacaxi.

2. CONSUMO DE BEBIDAS À BASE DE FRUTAS

A produção de sucos de frutas ocupa papel relevante na indústria agrícola e é um dos mais promissores negócios do mundo em termos de comércio internacional, com importante participação dos países em desenvolvimento (Indi, 2007).

O mercado brasileiro de suco pronto para beber vem se destacando na área de bebidas desde 1996. Comparando-se o ano de 2001 com 1996, este segmento cresceu 270%. Nos primeiros seis meses de 2002, foram comercializados 26,3 milhões de litros de suco pronto, contra 16,4 milhões no mesmo período de 2001. Dos seis mil lares entrevistados, que representou cerca de 31 milhões de lares brasileiros, 18,5% compraram pelo menos uma vez suco pronto para beber nos primeiros seis meses de 2002. No mesmo período de 2001, apenas 12% haviam comprado o produto (Consumidor Moderno, 2002).

Neste mercado destacam-se os sucos de frutas tropicais, tais como caju, maracujá, abacaxi, goiaba, graviola, tamarindo, acerola, pitanga, umbu, mamão e açaí. O Brasil, devido às condições climáticas ímpares de seu território, à sua histórica tradição agropastoril e ao estágio de desenvolvimento de sua agricultura, reúne todas as condições de se estabelecer como supridor mundial desses sucos, como já ocorre com o de laranja (Indi, 2007).

Em pesquisa realizada por Savitci et al., em 1995, os países que mais importaram o suco de abacaxi brasileiro foram os EUA, Holanda, Inglaterra, Itália e Espanha; e em menor escala, França, Canadá, Alemanha, Portugal, Finlândia e Bélgica.

Além do grande potencial em termos de exportações, o próprio mercado interno brasileiro oferece grandes perspectivas de expansão. O consumo interno de suco por ano está em torno de 2 litros per capita; enquanto nos países desenvolvidos a média é de 35 litros per capita. Por essa, entre outras razões, o consumo de sucos no Brasil cresce, em média, 15,58% ao ano (Indi, 2007).

Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais destaca-se como um pólo receptor de investimentos para a produção e o processamento de frutas, visando a fabricação de polpa, sucos e ainda para o consumo “*in natura*” (Indi, 2007).

Apesar de haver muitas marcas no mercado, o segmento de sucos prontos ainda tem muito espaço para crescer no Brasil. Novas marcas estão se lançando, acirrando a disputa com os principais fabricantes de sucos do país que, por sua vez, oferecem novas opções de sabores e embalagens. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não-

Alcoólicas (ABIR), de janeiro a setembro de 2006, o volume de sucos prontos produzidos no país foi de 283,8 milhões de litros, o que representa um crescimento de 13,5% sobre o mesmo período de 2005. O faturamento é de cerca de R\$ 800 milhões (Estado de Minas, 2006).

A Tabela 2.1 apresenta o volume de sucos prontos produzidos em 2006 no mercado nacional (Abir, 2007).

Tabela 2.1. Volume (em mil litros) de sucos tropicais prontos produzidos em 2006.

Período	2006
Janeiro	29.961
Fevereiro / Março	68.720
Abril / Maio	63.167
Junho / Julho	59.074
Agosto / Setembro	62.887
Outubro / Novembro	69.783
Dezembro	
Total	353.593

* Fonte Abir, 2007.

A Tabela 2.2 apresenta a participação dos sabores de sucos tropicais e subtropicais prontos no mercado brasileiro em 2006 (Abir, 2007).

Tabela 2.2. Participação dos sabores (%) de sucos prontos no mercado interno em 2006.

Sabor	Jan	Fev/Mar	Abr/Mai	Jun/Jul	Agô/Set	Out/Nov	Dez	Ano
Uva	22,5	22,9	22,9	23,7	23,4	23,7		23,2
Pêssego	12,6	12,9	12,9	12,9	12,6	13,0		12,8
Laranja	11,7	11,6	11,8	11,7	11,5	11,5		11,6
Maracujá	9,1	9,0	8,7	8,7	8,6	8,5		8,8
Manjão	7,2	7,3	7,8	7,6	7,8	7,9		7,6
Morango	4,0	4,2	4,2	4,3	4,5	4,5		4,3
Abacaxi	2,5	2,5	2,4	2,3	2,4	2,4		2,4
Outros Sabores	30,4	29,6	29,3	28,8	29,2	28,5		29,3
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0
Regular	89,2	89,3	89,0	89,4	88,7	89,0		89,1
Diet/ Light	10,8	10,7	11,0	10,6	11,3	11,0		10,9
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0	100,0

* Fonte Abir, 2007.

Uva e pêssego se destacam como os sucos mais consumidos, de acordo com a Tabela 2.2.

3. MICROBIOLOGIA PREDITIVA

A microbiologia preditiva se apresenta como uma ferramenta importante para avaliação do crescimento de fungos termorresistentes em diferentes produtos; sendo possível prever o quanto o crescimento destes fungos poderá interferir na vida de prateleira dos produtos. Esta análise pode ser feita através de modelos matemáticos que descrevem o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições de temperatura, pH, atividade de água, entre outros fatores (Whiting, 1995; Zwietering et al., 1991; Cheroutre-Viale et al., 1998).

3.1. OBJETIVOS E APLICAÇÕES

Segundo Shimon & Labuza (2000), a microbiologia preditiva de alimentos é uma área promissora e em grande desenvolvimento da microbiologia de alimentos. Ela tem recebido significativa atenção científica nos últimos anos, fornecendo base de dados e pacotes de *softwares* que podem ser ferramentas úteis na análise de riscos.

A microbiologia preditiva é considerada uma área multidisciplinar, pois abrange conhecimentos de microbiologia, engenharia e estatística para fornecer prognósticos convenientes sobre o comportamento microbiano em alimentos (Schaffner & Labuza, 1997).

O objetivo da microbiologia preditiva é descrever matematicamente o crescimento ou a diminuição de microrganismos presentes em alimentos sob condições ambientais específicas (Whiting, 1995; Membré et al., 2005; McMeekin et al., 1997; Ross, 1999). Whiting (1995) e Ross & McMeekin (1994) reportaram que com a habilidade de descrever, vem a habilidade de prever combinações de condições onde não existem dados experimentais, dentro de uma faixa apropriada de cada condição.

Os microbiologistas de alimentos têm procurado modelos eficientes para o crescimento microbiano que possam permitir a previsão de consequências microbiológicas na estocagem de alimentos (Baranyi & Roberts, 1994). Eles utilizam três parâmetros na caracterização da curva de crescimento microbiano: a duração da fase lag (λ), a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e a densidade populacional máxima (A); sendo que todos os três precisam ser estimados de forma precisa (Baty & Delignette-Muller, 2004).

Segundo Dalgaard & Koutsoumanis (2001), a estimativa exata dos parâmetros de crescimento, particularmente a velocidade específica máxima de crescimento e a duração da fase lag, é essencial em muitas áreas da microbiologia. Alguns exemplos são: a caracterização de efeitos antimicrobianos, a otimização de meios microbiológicos e o desenvolvimento de modelos cinéticos utilizados nas tecnologias de alimentos e de fermentação.

A microbiologia preditiva também tem utilidade na elaboração de planos de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), identificando perigos e pontos críticos, especificando limites e ações corretivas (McMeekin & Ross, 2002; Versyck et al., 1999; Skinner et al., 1994).

Modelos que descrevem o crescimento da população de microrganismos formam a base da estratégia adotada para a segurança alimentar. A avaliação do risco em segurança alimentar requer conhecimento da probabilidade que o tamanho da população microbiana não excederá valores definidos. Essa probabilidade geralmente limita a vida de prateleira de muitos alimentos (Soboleva et al. 2000; Kakiomenour et al., 1995; Jacxsens et al., 2003; Corbo et al., 2004).

Davey (1994), Alavi et al. (1999) e Van Impe et al. (1995), reportaram que o uso de modelos preditivos pode reduzir a necessidade de análises laboratoriais dispendiosas e, a longo prazo, poderá ser considerado um pré-requisito para o controle computacional de operações e para a otimização de processos.

Segundo McClure et al. (1994), as aproximações feitas pela microbiologia preditiva estão sendo largamente aceitas; sendo que o verdadeiro poder destas aproximações é que, ao contrário do processo tradicional de estocagem, os modelos, uma vez validados, podem ser utilizados para prever rapidamente e com segurança a resposta dos microrganismos sob várias condições.

3.2. MODELOS PREDITIVOS

Segundo Baranyi & Roberts (1994), a experiência mostra que os modelos matemáticos utilizados na microbiologia preditiva, não podem ser simplesmente copiados daqueles elaborados há muitos anos para a biotecnologia e a engenharia química. Estes autores reportaram que são muitas as razões para que a microbiologia preditiva de alimentos construa suas próprias ferramentas estatístico-matemáticas. Algumas destas razões são:

- O objetivo dos microbiologistas de alimentos é minimizar ou prevenir o crescimento microbiano, fazendo com que os fatores inibitórios sejam investigados mais profundamente; ao contrário do que ocorre na biotecnologia que visa a otimização do processo.
- A concentração de células de interesse é muito menor do que na biotecnologia (maior que 10^6 ou 10^7 células/mL). Consequentemente, alguns métodos que são validados a altas concentrações celulares, como a turbidimetria e as medidas de condutância, não podem ser aplicados diretamente; sendo necessário estabelecer a relação entre o número de células e a medida na menor concentração celular.
- A cinética da fase lag, que é pouco importante em um biorreator, é de grande importância na microbiologia de alimentos.
- A quantidade de informações sobre a composição físico-química do alimento é menor e menos exata quando comparada a de um biorreator, consequentemente, os métodos estatístico-matemáticos aplicados envolvem várias simplificações e elementos empíricos.

Segundo Soboleva et al. (2000), os modelos que descrevem o crescimento microbiano formam a base para a adoção de estratégias na área de segurança alimentar. O objetivo de um modelo é prever quando e em quais circunstâncias, o número microbiano crescerá a um nível que possa ameaçar a saúde pública.

Os modelos desenvolvidos na microbiologia preditiva podem ser utilizados para calcular o número de microrganismos presentes em um alimento, dado a composição específica, a linha de produção e a cadeia de distribuição do mesmo (Wijtzes et al., 1998).

Segundo Baranyi & Roberts (1995), do ponto de vista matemático, os termos função e modelo não são equivalentes. Os autores definem função como uma abstração matemática que facilita a descrição de um modelo particular; enquanto modelo matemático se refere a uma série de hipóteses básicas de um processo estudado, algumas das quais podem ser expressas por meio de funções ou de equações diferenciais.

Segundo Stringer & Dennis (2000), o desenvolvimento de um modelo microbiológico deve incluir as seguintes etapas:

- Seleção cautelosa e preparação apropriada do microrganismo alvo;
- Inoculação do microrganismo alvo em um meio de cultura com características definidas;

- Armazenamento do meio de cultura sob condições controladas;
- Amostragem dos meios de crescimento para o microrganismo alvo em determinados intervalos de tempo;
- Construção de um modelo que descreva as respostas do microrganismo alvo;
- Validação das predições do modelo, tendo como preferência a validação do modelo em um alimento para assegurar que são significativas;
- Reparametrização ou melhoramento do modelo.

Os modelos preditivos são classificados de acordo com o comportamento da população que descrevem. Dessa forma, existem modelos de crescimento, de inativação (Whiting, 1995; McMeekin & Ross, 2002) e de limites ou interfaces de crescimento (Modelos cresce-não cresce) (McMeekin & Ross, 2002).

De acordo com McMeekin & Ross (2002), Krist et al. (1998) e Kilcast & Subramaniam (2000), os modelos são classificados em mecanísticos ou empíricos, dependendo se apresentam ou não um embasamento teórico. Os modelos mecanísticos descrevem, com base teórica, a resposta microbiana. No entanto, estes modelos são raros devido à complexidade da fisiologia microbiana. Os modelos empíricos descrevem matematicamente os dados, porém não fornecem uma boa introspecção do processo. Estes modelos empíricos podem ser divididos em modelos cinéticos e probabilísticos.

Os modelos cinéticos são baseados no estudo do comportamento da população microbiana em função do tempo; já os modelos probabilísticos examinam a probabilidade de que um microrganismo responda crescendo, morrendo ou produzindo um metabólito num dado período de tempo (McMeekin & Ross, 2002; Ross & McMeekin, 1994; Whiting, 1995).

Whiting & Buchanan (1993) propuseram uma classificação dos modelos matemáticos utilizados na microbiologia preditiva, onde os modelos são divididos em primários, secundários e terciários. De acordo com Whiting (1995), os modelos primários e secundários podem ser lineares ou não lineares; segregados, quando a população é definida por células heterogêneas, ou não segregados, quando a população é definida por uma população média de células; estruturado, quando é formado por vários componentes, ou não estruturado, quando é formado por um único componente.

Esta classificação é apresentada a seguir.

3.2.1. Modelos Primários

Os modelos primários descrevem mudanças no número de microrganismos ou nas respostas microbianas (produção de toxinas e/ou enzimas) com o tempo, num ambiente específico. Estes modelos podem estimar a quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL), formação de toxinas, níveis de substrato e produtos metabólicos; que são medidas diretas de resposta (Swinnen et al., 2004; Whiting, 1995).

Uma equação ou função matemática descreve a mudança da resposta com o tempo, fornecendo um grupo de valores dos parâmetros. Os parâmetros obtidos pelos modelos primários são: λ - duração da fase lag (horas), μ_{\max} - velocidade específica máxima de crescimento (horas^{-1}) e A - aumento logarítmico da população (UFC/mL). Estes parâmetros podem ser visualizados na Figura 2.1.

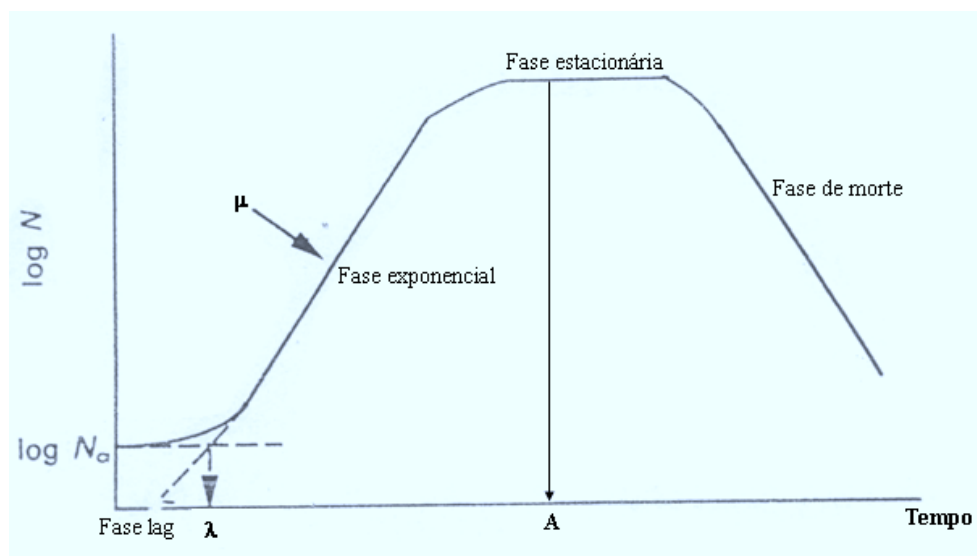


Figura 2.1. Curva Típica de Crescimento Microbiano (Van Impe et al. 1995; Swinnen et al. 2004).

A curva de crescimento, Figura 2.1, apresenta um comportamento sigmoidal (Van Impe et al. 1995). Em condições de crescimento, a fase lag é um período no qual as células microbianas modificam a si mesmas ao invés de tirar vantagem do novo ambiente e iniciar o crescimento exponencial (Buchanan & Klawitter, 1991). Pelo fato do crescimento de microrganismos ser inaceitável em produtos alimentícios, é necessário predizer a fase lag com exatidão, o que nem sempre é alcançado (McMeekin et al., 1997; McKellar, 1997). Dada a curva típica de crescimento

sigmoidal, observada em ambiente constante, a fase lag foi definida, como a interseção da linha definindo a taxa específica máxima de crescimento com o nível de inóculo (Pirt, 1975; Soboleva et al. 2000; Perni et al. 2005). A taxa específica máxima de crescimento foi definida como a tangente da taxa de crescimento no ponto de inflexão (Soboleva et al. 2000; Perni et al. 2005). O aumento logarítmico da população é definido como a assíntota superior (Garthright, 1997).

Alguns exemplos de modelos primários são: o modelo de primeira ordem de Monod (Labuza & Fu, 1993), o modelo Logístico, o modelo de Schnute (Zwietering et al., 1990), o modelo de Boltzman (Erkmen & Alben, 2002), o modelo de inativação térmica de primeira ordem (Whiting, 1995) e os modelos mais utilizados na literatura, que são os modelos de Baranyi e Roberts (1995) e o de Gompertz (Gibson et al., 1987).

Vários pesquisadores (Ratkowsky et al., 1983; Zwietering et al., 1994 a,b; Rosso et al., 1995; Wijtzes et al., 1995; Henk et al., 1997; Ganzle et al., 1998) têm proposto uma variedade de modelos, na forma de curvas algébricas, para descrever o comportamento microbiano em resposta a fatores ambientais como temperatura, pH, salinidade, entre outros. Geralmente, esses modelos são baseados em variações dos modelos de Gompertz, Logístico ou Richards (Soboleva et al. 2000).

3.2.1.1. Modelo de Gompertz Modificado

O modelo de Gompertz tem sido amplamente utilizado para descrever o comportamento microbiano em alimentos (Masson et al., 2002; Whiting, 1995; Buchanan et al., 1997). Este modelo foi introduzido na microbiologia de alimentos por Gibson et al., em 1987, quando compararam a equação logística e a de Gompertz na parametrização de uma curva de crescimento de *Clostridium botulinum* (Ross & McMeekin, 1994; Giannuzzi et al., 1998; Labuza & Fu, 1993).

O modelo de Gompertz é representado pela Equação 2.1 (Erkmen, 2001).

$$\ln y = A \cdot \exp\{-\exp[-B(t - M)]\} \quad (2.1)$$

Na equação 2.1, y é a densidade da população (logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mililitros) em um dado tempo t em horas; A é o aumento logarítmico da população; B é a velocidade relativa máxima de crescimento no tempo M (h^{-1}); e M é o tempo

necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento (h). Os parâmetros A , B e M , são estimados pelo modelo. Estes parâmetros estão relacionados com os parâmetros microbiológicos de crescimento λ (duração da fase lag) e μ_{\max} (velocidade específica máxima de crescimento) pelas equações 2.2 e 2.3.

$$\mu_{\max} = \frac{B \cdot A}{e} \quad (2.2)$$

Onde $e = 2,7182$.

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B} \right) \quad (2.3)$$

O modelo de Gompertz foi modificado por Zwietering et al. em 1990. A reparametrização foi feita para que os parâmetros estimados pudessem ter um significado biológico. Assim, os parâmetros μ_{\max} (velocidade específica máxima de crescimento) e λ (duração da fase lag) foram introduzidos no modelo; o que facilitou o encontro de valores iniciais e o cálculo de intervalos de confiança durante o ajuste da curva (Labuza & Fu, 1993; Van Impe et al., 1995).

Segundo Zwietering et al. (1990), em quase todos os casos testados, o Modelo de Gompertz Modificado é estatisticamente suficiente para descrever dados de crescimento e também é o mais simples de utilizar (Van Impe et al., 1995; Whiting, 1995).

O modelo de Gompertz Modificado é apresentado na Equação 2.4.

$$\ln y = A \exp \left\{ - \exp \left\{ \left(\frac{\mu_{\max} e}{A} \right) (\lambda - t) \right\} + 1 \right\} \quad (2.4)$$

Os parâmetros podem ser determinados ajustando-se o modelo de Gompertz Modificado aos dados pelo método iterativo de Gauss-Newton ou qualquer outro método iterativo de estimação, que determine o melhor ajuste de acordo com o critério dos mínimos quadrados (Whiting, 1995).

De acordo com Labuza & Fu (1993), tanto o modelo de Gompertz quanto o modelo de Gompertz Modificado têm sido testados em muitas espécies de microrganismos com ótimos ajustes. No entanto, o ajuste do modelo de Gompertz é muito afetado pelo número de observações utilizadas na construção da curva, bem como pela qualidade estatística das observações (Bratchell

et al., 1989). Para um bom ajuste do modelo são necessários pelo menos 15 pontos experimentais distribuídos uniformemente ao longo de toda a curva de crescimento. Isto se torna um problema quando o crescimento é muito rápido, se a duração da fase lag é muito curta ou se o experimento termina antes que a fase estacionária seja atingida (Labuza & Fu, 1993).

3.2.1.2. Modelo Logístico

O modelo Logístico para descrever o crescimento microbiano é apresentado na Equação 2.5 (Erkmen, 2000).

$$\ln y = \frac{A}{[1 + \exp(D - Bt)]} \quad (2.5)$$

Na equação 2.5, y é a densidade da população (logaritmo do número de unidades formadoras de colônias por mililitros) em um dado tempo t em horas; A é o aumento logarítmico da população; D é um parâmetro adimensional; e B é o crescimento relativo na metade do tempo da fase exponencial (h^{-1}). Estes parâmetros estão relacionados com os parâmetros microbiológicos de crescimento λ (duração da fase lag) e μ_{\max} (velocidade específica máxima de crescimento) pelas equações 2.6 e 2.7.

$$\mu_{\max} = \frac{AB}{4} \quad (2.6)$$

$$\lambda = \frac{(D - 2)}{B} \quad (2.7)$$

Os parâmetros podem ser determinados ajustando-se o modelo Logístico aos dados pelo método iterativo de Gauss-Newton ou qualquer outro método iterativo de estimação, que determine o melhor ajuste de acordo com o critério dos mínimos quadrados (Whiting, 1995).

As curvas de crescimento de microrganismos são geralmente bem descritas pelo modelo Logístico (Verhulst, 1838; Pearl, 1927; Vadasz et al., 2001). Uma curva de crescimento descrita com este modelo é sigmoideal em um plano cartesiano ordinário (Fujikawa et al., 2004).

3.2.2. Modelos Secundários

Os modelos secundários descrevem como os parâmetros do modelo primário variam com fatores ambientais, como temperatura, pH, atividade de água, concentração de agentes microbianos, entre outros (Whiting, 1995; Schaffner & Labuza, 1997; Swinnen et al., 2004; Garthright, 1997).

Nos últimos anos, muitos modelos secundários têm sido propostos na literatura. Alguns exemplos são os polinomiais ou metodologia de superfície de resposta, equação de Arrhenius, modelo da Raiz Quadrada ou de Ratkowsky (Schaffner & Labuza, 1997; Whiting, 1995; McMeekin & Ross, 2002; Davey & Daughtry, 1995).

Em microbiologia preditiva, a temperatura, o pH e a atividade de água são considerados os fatores ambientais mais importantes na determinação do crescimento microbiano em alimentos. De acordo com Giannuzzi et al. (1998), a temperatura é, sem dúvida, o fator mais importante nas reações de deterioração de alimentos, principalmente na deterioração microbiana; uma vez que a velocidade específica máxima de crescimento e a duração da fase lag são altamente dependentes da temperatura. Nem sempre a temperatura de refrigeração é mantida constante durante a manipulação e o transporte, mesmo estando diretamente ligada à estabilidade microbiológica dos alimentos. Dessa forma, os efeitos da temperatura na estabilidade microbiana têm sido estudados por muitos pesquisadores, através de modelos computacionais baseados na transferência de calor e estimativas de crescimento (Ratkowsky et al., 1982; Zwietering et al., 1991; McMeekin et al., 1992; Buchanan, 1993; Almonacid-Merino & Torres, 1993).

Os modelos de Arrhenius e de Bélehrádek (Modelo da Raiz Quadrada) são as duas maiores classes de modelos secundários que têm sido propostos para descrever o efeito da temperatura no crescimento microbiano (Cayré et al., 2003). O efeito de flutuações de temperatura na fase lag e na velocidade específica de crescimento, em meio líquido, foi estudado por Li & Torres (1993).

3.2.2.1. Modelo da Raiz Quadrada

O modelo de Bélehrádek ou modelo da Raiz Quadrada é um modelo empírico, desenvolvido em 1926, baseado na relação linear entre a raiz quadrada de um parâmetro de crescimento (fase lag, velocidade específica máxima de crescimento ou aumento logarítmico da

população) e a temperatura (Cayré et al., 2003). Este modelo foi modificado por Ratkowsky et al. (1982) para descrever o efeito da temperatura na velocidade específica máxima de crescimento. Zwietering et al. (1991) modificaram o modelo estendido de Ratkowsky para descrever o efeito da temperatura na fase lag.

O modelo da Raiz Quadrada ou de Ratkowsky é apresentado na Equação 2.8.

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (2.8)$$

Na equação 2.8, k representa qualquer parâmetro biológico de crescimento (velocidade específica máxima de crescimento, duração da fase lag ou aumento logarítmico da população); b é a constante de regressão; T_{\min} é a temperatura mínima teórica de crescimento; e T é a temperatura (Van Impe et al., 1992).

3.2.3. Modelos Terciários

De acordo com Whiting (1995), os modelos terciários são ferramentas, onde as rotinas dos *softwares* computacionais transformam os modelos primários e os modelos secundários em programas amigáveis. Estes programas podem calcular as respostas microbianas de acordo com as mudanças ocorridas nas condições ambientais, comparar o efeito das diferentes condições ou contrastar o comportamento de vários microrganismos.

3.3. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Uma grande quantidade de dados é necessária quando o crescimento de um ou mais microrganismos é estudado; uma vez que os parâmetros de crescimento (duração da fase lag, velocidade específica máxima de crescimento e aumento logarítmico da população) são obtidos com boa exatidão, quando uma quantidade suficiente de repetições é feita e, desde que cada repetição contenha um número suficiente e bem distribuído de pontos experimentais. Este problema é ainda maior se o crescimento for avaliado em função de diferentes condições, como temperatura, pH ou atividade de água (Augustin et al., 1999; Begot et al., 1996).

De acordo com Augustin et al. (1999), o desenvolvimento de modelos na microbiologia preditiva requer uma grande quantidade de dados. Estes dados de crescimento são geralmente obtidos pelo método de contagem de colônias por diluição ou plaqueamento. Este método, mesmo exigindo grande limitação de tempo e não fornecendo resultados imediatos, tem sido utilizado como método padrão para métodos alternativos que vêm sendo desenvolvidos. Alguns exemplos de métodos alternativos são as medidas de impedância, radiometria, determinação de ATP e citometria de fluxo.

Uma forma de acompanhar, em tempo real, o crescimento microbiano é através da Densidade Ótica (DO); um método já estabelecido e chamado de turbidimetria (Begot et al., 1996). A turbidimetria tornou-se um método atrativo, devido ao aparecimento de sistemas turbidimétricos automatizados (Augustin et al., 1999; Begot et al., 1996); e recentemente, foi utilizado por alguns autores para estimar os parâmetros de crescimento através do Modelo de Gompertz Modificado (Begot et al., 1996; Chorin et al., 1997; Dalgaard & Koutsoumanis, 2001; Cheroutre-Viale et al., 1998).

A estimativa dos parâmetros de crescimento por medidas de absorbância tem a vantagem de ser rápido, não destrutivo, barato e relativamente fácil de automatizar, quando comparado a outras técnicas e, particularmente, quando comparado a contagem de viáveis clássica (Dalgaard & Koutsoumanis, 2001; Swinnen et al., 2004).

3.3.1. Avaliação do Crescimento de Fungos

De acordo com Gibson & Hocking (1997), a avaliação do crescimento de fungos pela medida da taxa de extensão das hifas, normalmente chamada de taxa de crescimento radial, expressa em $\mu\text{m/h}$, é provavelmente, a medida mais simples e direta, mas não necessariamente representa a verdadeira natureza do crescimento do fungo. Contrariamente às bactérias, que se reproduzem por cissiparidade e cujo crescimento normalmente ocorre apenas na superfície de meios sólidos ou de forma homogênea através de um meio líquido, as hifas produzidas pelos fungos podem penetrar nos alimentos em três dimensões (Samapundo et al., 2005). Todavia, este método de medida de diâmetro da colônia tem sido bastante utilizado para quantificar o crescimento de fungos, como o estudo realizado por Molina & Giannuzzi (1999), que avaliaram o efeito da combinação de temperatura e de concentrações de ácido propiônico no crescimento de

Aspergillus parasiticus; e o estudo realizado por Valík & Piecková (2001) que determinaram o efeito da atividade de água no crescimento de fungos termorresistentes. Outros pesquisadores utilizaram a taxa de crescimento radial para avaliação do crescimento de fungos, como López-Malo et al. (2005) que avaliaram o crescimento de *Aspergillus flavus* em meio PDA sob o efeito combinado de atividade de água, pH e agentes antimicrobianos; Gibson et al. (1994) que estudaram o efeito da atividade de água no crescimento de *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus* e *A. nomius* em meios contendo glicose e frutose; e Peña et al. (2004) que avaliaram o crescimento de *Paecilomyces variotti* em suco de abacaxi.

Langvad (1999) reportou que o crescimento de fungos filamentosos, em cultura líquida, pode ser medido através do aumento do peso seco de culturas realizadas em frascos erlenmeyers de 500 mL estacionários ou agitados. O autor observou que houve uma relação linear similar para diferentes fungos entre absorbância (lida a 630 nm) e o peso seco, com um coeficiente angular de 4,2 mg/mL de peso seco por unidade de absorbância.

O efeito de extratos de pimenta associados ao efeito do calor no crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* foi estudado por Akpomedaye & Ejechi (1998). A inibição do crescimento foi medida pela quantificação da biomassa, que foi filtrada e seca até peso constante.

3.4. MICROBIOLOGIA PREDITIVA NA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS

O uso de modelos preditivos amplamente aceitos no estudo do crescimento bacteriano, também tem se mostrado como uma importante ferramenta no estudo do crescimento de fungos. Porém, a modelagem preditiva do crescimento de fungos filamentosos não tem recebido tanta atenção quanto o crescimento bacteriano, provavelmente devido à complexidade de se quantificar o seu crescimento (Baranyi et al., 1996; Samapundo et al., 2005).

Erkmen & Alben (2002), avaliaram diferentes modelos não lineares para estimar os parâmetros μ (g/L), λ (dias) e A (g/L) na produção de ácido cítrico e na formação de biomassa por *Aspergillus niger* em cultura submersa. A biomassa foi quantificada por filtração de uma amostra de 15 mL retirada do fermentador a cada 15 dias. Após a filtração, o micélio foi seco a 105°C até

peso constante. Os parâmetros biológicos foram estimados pelo Modelo de Gompertz Modificado com sucesso.

Utilizando a medida do diâmetro da colônia, Cuppers et al. (1997) desenvolveram um modelo com a taxa de crescimento em função da temperatura e da concentração de sal, para prever o tempo necessário para que a colônia atinja um tamanho visível (3 mm). A medida do diâmetro também foi utilizada por Baranyi et al. (1996) para modelar o efeito da atividade de água na taxa de crescimento da colônia de quatro espécies de *Aspergillus*.

Molina & Giannuzzi (1999) utilizaram o modelo de Arrhenius para avaliar o efeito da temperatura e da concentração de ácido propiônico no crescimento de *Aspergillus parasiticus*. O crescimento foi medido pelo aumento do diâmetro da colônia por unidade de tempo.

Valík et al. (1999) estudaram o efeito da atividade de água no crescimento de *Penicillium roqueforti* através das técnicas da microbiologia preditiva. Pela medição do diâmetro, o crescimento da colônia foi modelado por uma função quadrática ajustada aos valores de atividade de água transformados.

Cunha (2003) avaliou o crescimento de *B. nivea* e *N. fischeri* pelo método de diluição e plaqueamento, em sucos naturais de abacaxi e maracujá, às temperaturas de 20°C e 30°C. O Modelo de Gompertz Modificado ajustou-se bem aos dados experimentais, apresentando coeficientes de correlação que variaram de 0,90 a 0,99.

Os trabalhos publicados sobre o efeito de fatores ambientais como atividade de água, pH, temperatura, tensão de oxigênio, luminosidade, conservantes e ácidos orgânicos no crescimento de fungos termorresistentes são poucos; sendo que estes dados poderiam ser modelados matematicamente (Valík & Piecková, 2001).

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

1. FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

1.1. MICRORGANISMOS ESTUDADOS

Os microrganismos utilizados para avaliação do crescimento foram: *Byssoschlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*. Ambos foram obtidos do laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina. O fungo *Neosartorya fischeri* foi isolado e identificado por Salomão (2002) em amostras retiradas da linha de processamento de néctar de maçã. O fungo *Byssoschlamys nivea* foi isolado por Aragão (1989), em experimentos realizados no Laboratório de Termobacteriologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

A partir das suspensões de esporos estocadas a 4°C, foram preparadas novas suspensões em temperaturas pré-definidas, para utilização nos experimentos.

1.2. PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES

As suspensões de *N. fischeri* e *B. nivea* foram preparadas em garrafas de Roux, de acordo com a metodologia descrita por Salomão (2002). Inicialmente, transferiu-se 0,4 mL da suspensão mãe (citada no item 1.1) para um tubo com tampa rosqueável de 16X100 mm contendo 4,0 mL de solução 0,05% de Tween 80, para dispersar os esporos. Garrafas de Roux contendo 180 mL de Ágar Extrato de Malte (MEA, pH 5,4, formulado conforme Pitt & Hocking, 1985) foram inoculados, com pipeta estéril, com 0,5 mL da suspensão previamente preparada de cada cepa de fungo isolado.

Este procedimento foi realizado em 15 garrafas para cada uma das cepas isoladas, e a incubação procedeu-se a 25°C, 30°C e 35°C por 30 dias, para permitir a esporulação e desenvolvimento das estruturas de resistência dos fungos.

1.3. COLETA DOS ASCÓSPOROS DAS GARRAFAS DE ROUX

A coleta dos ascósporos foi realizada segundo metodologia descrita por Salomão em 2002. Transcorrido o período de um mês para o amadurecimento dos esporos, vinte e cinco mililitros de água destilada estéril foram transferidos para cada garrafa contendo os fungos, e a superfície foi

raspada levemente com o auxílio de pérolas de vidro e uma bagueta de vidro estéril. A suspensão resultante foi filtrada através de camadas de gaze estéril, para remover os fragmentos de hifas e centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a lavagem do precipitado em água estéril, seguida de outra centrifugação e lavagem por duas vezes. A ausência de hifas e a obtenção de ascósporos livres e ascos foi verificada microscopicamente. A suspensão final foi preparada ressuspensando o precipitado em um volume de água suficiente para se obter uma suspensão bastante concentrada (na ordem de 10^6 a 10^8 ascósporos/mL). A suspensão foi estocada sob refrigeração (4°C) em recipientes contendo pérolas de vidro, para facilitar a homogeneização antes do uso.

1.4. QUANTIFICAÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

Para a verificação do número de ascósporos ativados, expresso em ascósporos/mL, foi feita, de forma asséptica, uma diluição de cada uma das suspensões de esporos de *Byssoschlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*, utilizando-se para isso tubos de diluição com rosca de 16X100 mm contendo 4,5 mL de água destilada estéril e 0,5 mL da suspensão de esporos. Em seguida, estes tubos (diluição 10^{-1}) foram ativados em banho termostático (Tecnal-TE-184), ajustado previamente à temperatura de 80°C, por 30 minutos (Rajashekhara et al., 1996). Transcorrido este tempo, os tubos foram retirados do banho termostático e resfriados imediatamente em banho de gelo (Salomão, 2002). A ativação térmica teve por finalidade interromper o estado de dormência dos ascósporos pela aplicação de calor. Após a ativação, foram feitas diluições seriais em ordem crescente (10^{-1} até 10^{-7}), em câmara de fluxo, com o objetivo de quantificar os ascósporos ativados. A partir das diluições, foram realizados plaqueamentos em profundidade em meio PDA (Ágar Batata Dextrose - Biolife) acrescido de 50 mg/L de rosa de bengala, para evitar espalhamento das colônias e inibir outras formas microbianas (Baglioni, 1998). As placas foram incubadas a 30°C, envolvidas por um filme plástico para evitar ressecamento. A leitura do número de colônias formadas foi realizada no terceiro dia após o plaqueamento e confirmada no quinto. A contagem foi expressa em UFC/mL.

2. MEIOS DE CRESCIMENTO

2.1. SUCOS DE FRUTAS

Os meios de crescimento utilizados para a realização dos experimentos foram: suco de abacaxi comercial (pH 3,77 e 11,9°Brix originais) e suco de mamão comercial (pH 3,62 e 12,4°Brix originais), previamente processados e acondicionados em embalagens Tetra Pak de 1000 mL, com selagem de topo e lateral intactas. As caixas de suco foram adquiridas em supermercado local, sendo todas do mesmo fabricante e do mesmo lote de produção (março de 2006).

2.2. PADRONIZAÇÃO DOS SUCOS

2.2.1. Determinação da acidez

A acidez titulável foi medida através da quantidade de ácido presente no produto e determinada pela adição de uma solução alcalina padrão a um peso ou volume conhecido de amostra, até que estivesse totalmente neutralizada.

Para a determinação da acidez de produtos de frutas, utilizou-se solução de fenolftaleína 1%, solução de hidróxido de sódio 0,1 N padronizada com o seu respectivo fator de correção.

O cálculo da acidez foi realizado através da Equação 3.1:

$$Acidez = \frac{V \times N \times f \times 0,064 \times 100}{m} \quad (3.1)$$

Na Equação 3.1, V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra, em mL; N = normalidade da solução de hidróxido de sódio utilizada na titulação, em Normal; f = fator da solução de hidróxido de sódio utilizada na titulação; m = massa da amostra utilizada na titulação, em gramas.

O resultado foi expresso em gramas de ácido cítrico por gramas de amostra (m/m), já que este ácido é predominante nos sucos de frutas estudados (Pregnotatto & Pregnotatto, 1985).

2.2.2. Determinação do °Brix

A determinação do teor de sólidos solúveis totais, ou °Brix, foi feita pela adição de 3 gotas do suco de fruta entre os prismas do equipamento de leitura (refratômetro de ABBÉ - Instruterm), e, em seguida, realizada a leitura em °Brix (expresso em grama de sólidos solúveis totais por 100 gramas de amostra).

Deve-se fazer uma correção para obter o valor em °Brix real em relação à temperatura quando esta for diferente de 20°C.

2.2.3. Determinação do *Ratio*

Uma vez determinados o °Brix e a acidez, o *ratio* foi calculado (°Brix / acidez).

2.2.4. Ajuste dos valores de *Ratio*

O ajuste dos valores de *ratio* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Slongo (2004).

2.2.4.1. Baixos valores de *Ratio*

Para o ajuste destes valores de *ratio*, primeiramente fixou-se o °Brix dos sucos em 12°Brix para o suco de abacaxi e em 13°Brix para o suco de mamão; e, em seguida, adicionou-se uma solução de ácido cítrico 20% ao suco até que este apresentasse um valor de acidez de 1,2 para o suco de abacaxi e de 0,5 para o suco de mamão.

Para determinação do *ratio*, fez-se a relação do °Brix do suco com a acidez encontrada após a adição de ácido cítrico, onde os mesmos foram de 10 e 26 para abacaxi e mamão, respectivamente.

2.2.4.2. Elevados valores de *Ratio*

Para o ajuste destes valores de *ratio*, primeiramente fixou-se a acidez natural dos sucos em 0,5 para o suco de abacaxi e em 0,28 para o suco de mamão; e, em seguida, adicionou-se uma

solução de sacarose 60% no suco até que este apresentasse um valor de °Brix de 19 para o suco de abacaxi e de 18,5 para o suco de mamão.

Para a determinação do *ratio*, fez-se a relação do °Brix encontrado pela adição de sacarose com a acidez do suco, onde os mesmos foram de 38 e 66 para abacaxi e mamão, respectivamente.

3. ACOMPANHAMENTO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS

Foram realizados testes para escolher o melhor método para acompanhar o crescimento de *Neosartorya fischeri* e *Byssoschlamys nivea*. O meio escolhido para os testes foi o suco de abacaxi.

Os métodos testados foram: medida de absorbância, medida de peso seco e medida de diâmetro.

3.1. MÉTODOS TESTADOS

3.1.1. Método de Medida da Densidade Ótica ou Absorbância

Foram realizados ensaios utilizando o método de medida da densidade ótica ou absorbância para determinação do crescimento de *Byssoschlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*.

O suco de abacaxi utilizado foi centrifugado à rotação de 3500 rpm por 10 minutos e em seguida, pasteurizado a 110°C por 15 minutos dentro de frascos Erlenmeyer para garantir que não cresceriam outros microorganismos diferentes do estudado. Para a realização dos ensaios, foram preparados 35 frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de suco pasteurizado e 0,043 mL da suspensão de esporos (10^2 esporos/mL) ativados a 80°C por 30 minutos. Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 30°C em estufas BOD.

As medidas foram realizadas em intervalos pré-estabelecidos, até que se atingisse a fase estacionária de crescimento, ou seja, até o ponto em que não houvesse alteração no crescimento, o que era indicado pela estabilização das leituras, através das medidas realizadas nas amostras coletadas. A leitura foi realizada, a cada ponto do ensaio, pelo uso de um espectrofotômetro SPECTRONIC UNICAM, modelo Genesys 10 VIS, a um comprimento de onda de 400 nm. O líquido contido no frasco Erlenmeyer era homogeneizado durante 10 minutos e uma alíquota de

aproximadamente 2 mL era retirada e colocada em cubetas de plástico, para proceder a leitura. Foi utilizada água destilada como branco (Begot et al., 1996).

A Figura 3.1 apresenta os frascos Erlenmeyer com crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea*. Os frascos com a letra B representam o suco de abacaxi inoculado com *B. nivea* e os frascos com a letra N representam o suco inoculado com *N. fischeri*.

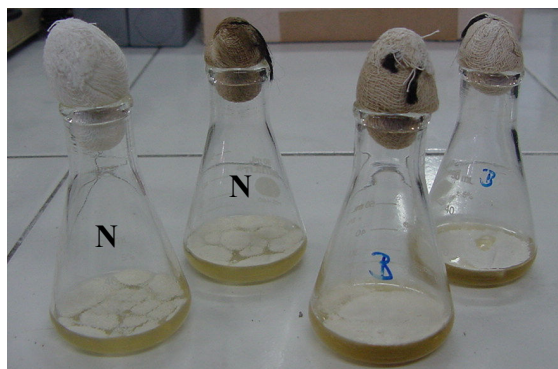


Figura 3.1. Frascos Erlenmeyer contendo suco de abacaxi inoculado com *N. fischeri* (letra N no frasco) e com *B. nivea* (letra B no frasco).

3.1.2. Método de Medida do Peso Seco

Foram realizados ensaios utilizando o método de medida do peso seco para determinação do crescimento de *Byssoschlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*.

O suco de abacaxi utilizado foi centrifugado à rotação de 3500 rpm por 10 minutos e em seguida, pasteurizado a 110°C por 15 minutos dentro de frascos Erlenmeyer para garantir que não cresceriam outros microorganismos diferentes do estudado. Para a realização dos ensaios, foram preparados 35 frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de suco pasteurizado e 0,043 mL da suspensão de esporos (10^2 esporos/mL) ativados a 80°C por 30 minutos. Os frascos Erlenmeyer foram incubados à 30°C em estufas BOD.

As medidas foram realizadas em intervalos pré-estabelecidos, até que se atingisse a fase estacionária de crescimento, ou seja, até o ponto em que não houvesse alteração no crescimento, o que era indicado pela estabilização das leituras, através dos pontos coletados. A determinação do peso seco foi feita, a cada ponto do ensaio, através de filtração de todo o líquido contido no frasco Erlenmeyer em membrana Whatman nº1, previamente seca, colocada em um suporte acoplado à

uma bomba de vácuo (Akpomedaye & Ejechi, 1998). Após a filtração, a membrana sofria processo de secagem em aparelho microondas PANASONIC, modelo NN-G52BK, ajustado na potência 2,0, permanecendo neste por um tempo de 15 minutos, para em seguida, ser levada ao dessecador, onde permanecia por mais 15 minutos para então ser pesada em balança analítica (Moritz, 2005).

3.1.3. Método de Medida do Diâmetro da Colônia

Foram realizados ensaios utilizando o método de medida do crescimento radial para determinação do crescimento de *Byssochlamys nivea* e *Neosartorya fischeri*.

A metodologia foi baseada na citada por Peña et al. (2004), Valík & Piecková (2001) e Gibson et al. (1994). O método consistiu em medições, a cada 12 horas, do maior diâmetro da colônia formada na superfície do suco de abacaxi, sendo a mudança do tamanho do diâmetro a expressão do crescimento do fungo.

Para o preparo do ensaio e melhor visualização das colônias formadas, o suco de abacaxi inoculado foi acondicionado em embalagens de PET com capacidade de 250 mL. Cada garrafa foi preenchida, assepticamente, com 230 mL de suco, previamente pasteurizado a 110°C por 15 minutos, para garantir que não cresceriam microrganismos diferentes do estudado. As garrafas foram inoculadas com 1 mL da suspensão de esporos (10^2 esporos/mL) ativados a 80°C por 30 minutos

As embalagens eram previamente sanitizadas com ácido peracético P3 Oxônia ativo 150 da Ecolab em solução aquosa na concentração de 0,3%, por um tempo de contato de 30 minutos. As tampas também eram sanitizadas pelo uso do mesmo produto, permanecendo pelo mesmo tempo de contato, entretanto a uma concentração inferior (0,05%). Após o tempo de contato, cada garrafa era enxaguada duas vezes com água destilada estéril e as tampas uma única vez (Silva, 2006).

As garrafas contendo suco de abacaxi inoculado foram estocadas a 30°C em câmara BOD e inclinadas em suporte com ângulo de 45°, para aumentar a área superficial e facilitar a leitura.

A Figura 3.2(a) apresenta as garrafas PET, com suco de abacaxi inoculado, em suporte inclinado a 45° (o suporte de madeira somente foi utilizado para leitura na lupa, por se ajustar melhor embaixo da mesma) e a Figura 3.2(b) apresenta a lupa TECNIVAL, modelo 5210, utilizada para leitura.

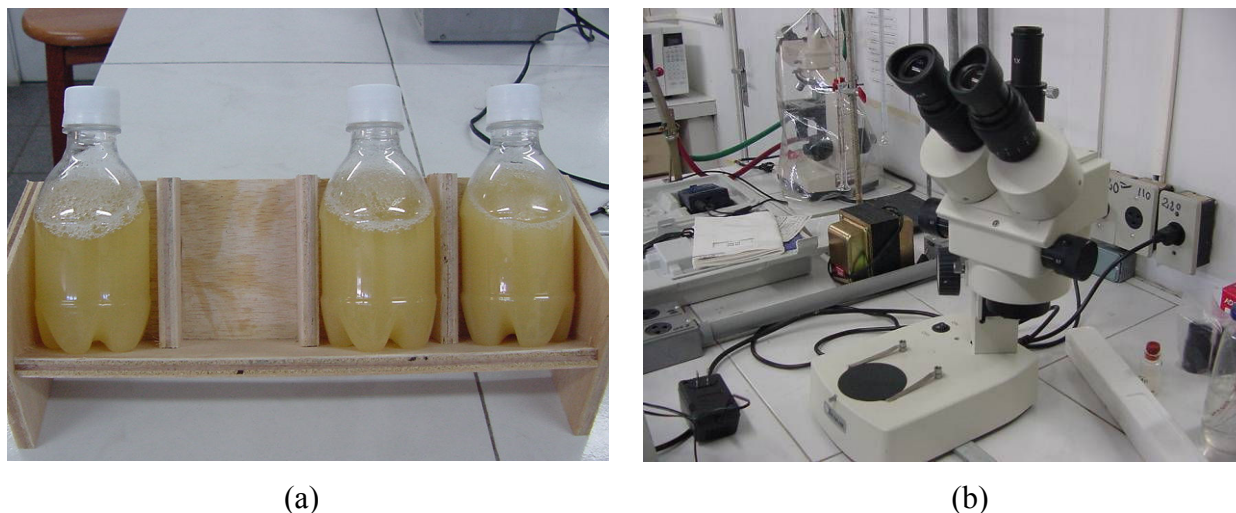


Figura 3.2. (a) Garrafas PET contendo suco de abacaxi inoculado, em suporte inclinado a 45°. (b) Lupa.

3.2. METODOLOGIA ESCOLHIDA

A metodologia da medida do diâmetro foi a que apresentou os melhores resultados para o acompanhamento do crescimento dos fungos em suco de abacaxi (ver item 1.1, 1.2 e 1.3 do Capítulo IV – Resultados e Discussão) e, portanto foi a escolhida para a realização dos experimentos do planejamento experimental com suco de abacaxi e suco de mamão.

Cada ensaio foi preparado com 4 réplicas e com uma garrafa sem o inóculo, servindo como controle.

4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONÁRIO

Com a finalidade de estudar o efeito combinado de alguns fatores no crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea* em suco de abacaxi e suco de mamão, foi elaborado um planejamento experimental fracionário 2^4 fatorial, com triplicata no ponto central. Os fatores analisados foram: temperatura de produção dos esporos, temperatura de crescimento do fungo, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa.

A Tabela 3.1 apresenta o planejamento experimental fracionário e os seus níveis estão apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3 para suco de abacaxi e para suco de mamão, respectivamente.

Tabela 3.1. Planejamento experimental fracionário para avaliação da influência dos fatores: temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento do fungo, *ratio* e espaço livre no crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea* em suco de abacaxi e suco de mamão.

Ensaio	T_e*	T**	R***	HS****
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

*T_e = Temperatura de produção dos esporos, **T = Temperatura de crescimento do fungo,

R = *Ratio* do suco, *HS = Espaço livre da garrafa

Tabela 3.2. Níveis do planejamento experimental para suco de abacaxi.

	-1	0	+1
Temperatura de produção dos esporos (°C)	25	30	35
Temperatura de crescimento (°C)	22	25	28
<i>Ratio</i> do suco	10	24	38
Espaço livre da garrafa (%)	8	18	28

Tabela 3.3. Níveis do planejamento experimental para suco de mamão.

	-1	0	+1
Temperatura de produção dos esporos (°C)	25	30	35
Temperatura de crescimento (°C)	22	25	28
<i>Ratio</i> do suco	26	46	66
Espaço livre da garrafa (%)	8	18	28

A temperatura de formação dos esporos *in vitro* serve para simular as condições nas quais os esporos foram formados no ambiente. Optou-se por 25°C, 30°C e 35°C por serem temperaturas típicas de regiões tropicais e subtropicais. Outro motivo é o fato de haver vários estudos reportados na literatura com 30°C (Salomão, 2002; Peña et al., 2004) e muito poucos com dados a 25°C e 35°C (Slongo, 2004).

A temperatura de crescimento foi escolhida entre 22°C e 28°C, pois estudos preliminares demonstraram que foi mais fácil medir o tempo de adaptação em temperaturas menores que a faixa ótima de crescimento do microrganismo, que se situa entre 30°C e 37°C para *B. nivea* e entre 30°C e 36°C para *N. fischeri* (Tournas, 1994). Outro motivo foi simular as condições ambientais às quais o suco pode estar exposto em região subtropical, visto que estes produtos são comercializados à temperatura ambiente.

A faixa de *ratio* foi escolhida considerando-se para o suco de abacaxi valores entre 20 e 50 e para o suco de mamão entre 38 e 63, envolvendo sucos simples e sucos concentrados (comunicação pessoal do fabricante). A utilização de *ratio* 10 para suco de abacaxi e 26 para suco de mamão foi incorporada para avaliar o efeito da acidificação com ácido cítrico no crescimento dos fungos. Esta metodologia também foi citada por Slongo (2004). Como este autor estudou a inativação de fungos termorresistentes e este fator se mostrou relevante, optou-se por analisar se o mesmo também era importante no crescimento.

Por fim, os valores de 8%, 18% e 28% de espaço livre foram escolhidos para simular espaços vazios maiores que os empregados nas embalagens Tetra Pak (< 4%) para analisar a influência da presença de oxigênio no crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea*. Outra razão foi a impossibilidade de analisar espaços livres com menos de 4%, pois a área superficial era muito pequena e não permitia a visualização diferenciada das colônias.

5. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

As curvas experimentais obtidas foram ajustadas pelos modelos de Gompertz Modificado e Logístico para obtenção dos parâmetros cinéticos de crescimento:

- Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) → tangente da taxa de crescimento no ponto de inflexão ou coeficiente angular da curva de crescimento, em mm/h;
- Diâmetro máximo atingido pela colônia (A) → assíntota superior, em mm;

- Duração da fase de adaptação (λ) → interseção da linha definindo a fase exponencial com o nível de inóculo, em horas.

5.1. TRATAMENTO DOS DADOS DE CRESCIMENTO

Os dados foram ajustados pelos modelos de Gompertz Modificado e Logístico, utilizando-se os *softwares* Project MMP (desenvolvido no laboratório PROFI, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, 2005) e Statistica 6.0, sendo que neste último os parâmetros do modelo foram calculados mediante regressão não linear (procedimento “*nonlinear estimation*”).

O Modelo de Gompertz Modificado foi reparametrizado a partir do modelo de Gompertz por Zwietering et al. (1990) para se obter diretamente os parâmetros de interesse e este está apresentado na Equação 3.2.

$$\ln y = A \exp \left\{ - \exp \left\{ \left(\frac{\mu_{\max} e}{A} \right) \times (\lambda - t) \right\} + 1 \right\} \quad (3.2)$$

Na Equação 3.2, y é o diâmetro da colônia (mm); A é o diâmetro máximo atingido pela colônia (mm); μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento (mm/h); λ é o tempo de duração da fase de adaptação (h); e t é o tempo (h).

O Modelo Logístico (Ratkowsky et al., 1982) é apresentado na Equação 3.3.

$$\ln y = \frac{A}{[1 + \exp(D - Bt)]} \quad (3.3)$$

Na Equação 3.3, y é o diâmetro da colônia (mm); A é o diâmetro máximo atingido pela colônia (mm); B e D são parâmetros do modelo e t é o tempo (h).

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e o tempo de duração da fase de adaptação (λ) foram calculados pelas equações 3.4 e 3.5, respectivamente, a partir dos parâmetros do modelo Logístico.

$$\mu_{\max} = \frac{A.B}{4} \quad (3.4)$$

$$\lambda = \frac{D-2}{B} \quad (3.5)$$

Para estudo do efeito da temperatura foi utilizado o modelo secundário da Raiz Quadrada (Davey, 1989), que é dado pela Equação 3.6.

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \quad (3.6)$$

Na Equação 3.6, k é representado por μ_{\max} , λ ou A ; b é um parâmetro fornecido pelo modelo; T é a temperatura em teste (K); e T_{\min} é outro parâmetro fornecido pelo modelo (K)

Os parâmetros do modelo foram calculados mediante regressão linear, através do *software* Statística 6.0.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PERFORMANCE DOS MODELOS

Para verificação dos modelos foram calculados os parâmetros estatísticos: coeficiente de correlação (r^2), Erro Quadrado Médio (MSE), Fator Bias e Fator de Exatidão (Samapundo et al., 2005).

O coeficiente de correlação (r^2) descreve o ajuste do modelo em toda a extensão da curva. Quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste do modelo.

O Erro Quadrado Médio (MSE) é dado pela Equação 3.7 e apresenta o erro do modelo em relação aos dados, ou seja, quanto os valores preditos são próximos dos valores observados. Portanto, quanto mais próximo de zero, melhor o ajuste.

$$MSE = \frac{RSS}{n} = \frac{\sum (v_{\text{observado}} - v_{\text{predito}})^2}{n} \quad (3.7)$$

Na Equação 3.7, $v_{\text{observado}}$ é o valor experimental; v_{predito} é o valor predito pelo modelo; e n é o número de dados menos os parâmetros do modelo.

O Fator Bias, que está apresentado na Equação 3.8, descreve se o modelo está falhando pelo lado seguro ou perigoso, ao predizer os dados. Quanto mais próximo de 1, melhor o parâmetro.

$$Bias = 10^{\left(\sum \log(v_{observado}/v_{predito})/n\right)} \quad (3.8)$$

Na Equação 3.8, $v_{observado}$ é o valor experimental; $v_{predito}$ é o valor predito pelo modelo; e n é o número de dados menos os parâmetros do modelo.

O Fator de Exatidão é o parâmetro estatístico mais idôneo e rigoroso, pois usa os valores preditos e os observados, avaliando a porcentagem de erro na predição. Este fator só leva em conta os valores absolutos. Quanto mais próximo de 1, menor a porcentagem de erro. O cálculo do Fator de Exatidão foi realizado aplicando a Equação 3.9.

$$Exatidão = 10^{\sum |\log(v_{observado}/v_{predito})|/n} \quad (3.9)$$

Na Equação 3.9, $v_{observado}$ é o valor experimental; $v_{predito}$ é o valor predito pelo modelo; e n é o número de dados menos os parâmetros do modelo.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. MÉTODOS DE MEDIDA DE CRESCIMENTO

1.1. MEDIDA DE CRESCIMENTO POR DENSIDADE ÓTICA E ABSORBÂNCIA

1.1.1. Crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi a 30°C

A Figura 4.1 mostra os dados experimentais de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi, incubado a 30°C e medido por absorvância a 400 nm.

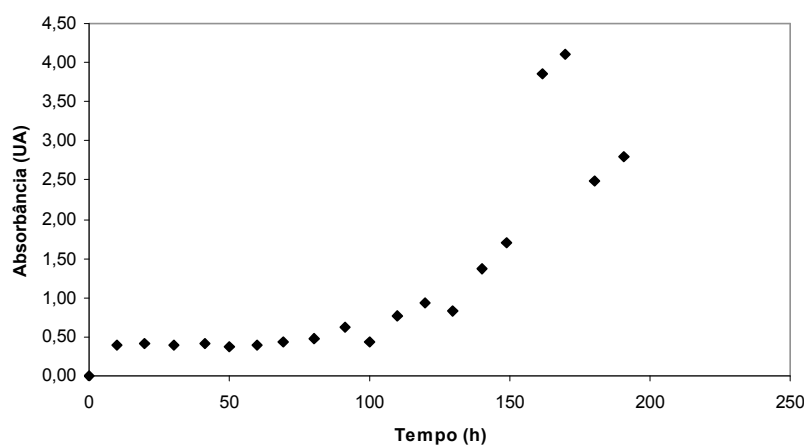


Figura 4.1. Dados experimentais de crescimento de *N. fischeri*, obtido por absorvância a 400 nm, em suco de abacaxi incubado a 30°C.

Através da Figura 4.1, pode-se observar a ausência de pontos na fase estacionária e uma fase lag e uma fase exponencial pouco características, gerando dados não representativos do crescimento de *N. fischeri*. Estes problemas foram observados devido à dificuldade de leitura da absorvância, uma vez que não foi possível homogeneizar perfeitamente as amostras antes da realização da leitura. Este mesmo comportamento foi observado em outros seis ensaios.

Pode-se concluir que este método experimental não é válido para medir o crescimento de fungos filamentosos em sucos, pois não gera dados reprodutíveis ou confiáveis.

Segundo Dalgaard & Koutsoumanis (2001) e Swinnen et al. (2004), a estimativa dos parâmetros de crescimento por medidas de absorvância tem a vantagem de ser rápido, por se tratar de um método não destrutivo, barato e relativamente fácil de automatizar, quando comparado a outras técnicas e, particularmente, quando comparado à contagem de viáveis clássica. Porém,

contrariamente às bactérias, cujo crescimento normalmente ocorre apenas na superfície de meios sólidos ou de forma homogênea através de um meio líquido, as hifas produzidas pelos fungos podem penetrar nos alimentos em três dimensões, dificultando a homogeneização do meio para a leitura (Samapundo et al., 2005).

1.1.2. Crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi a 30°C

A Figura 4.2 mostra os dados experimentais de crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi, incubado a 30°C e medido por absorbância a 400 nm.

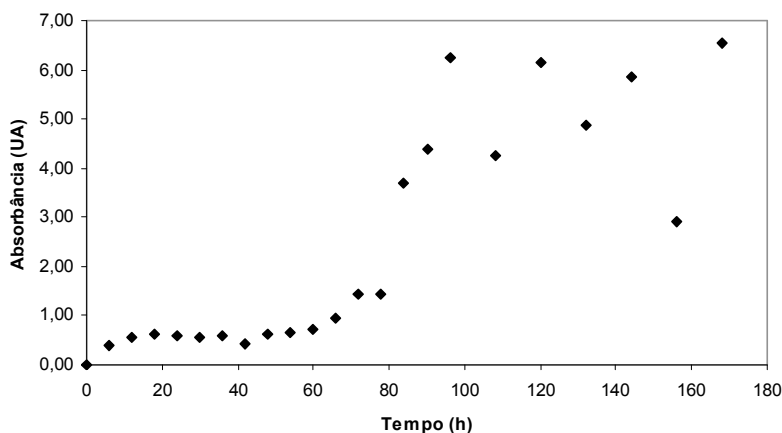


Figura 4.2. Dados experimentais de crescimento de *B. nivea*, obtido por absorbância a 400 nm, em suco de abacaxi incubado a 30°C.

Pela Figura 4.2, pode-se observar que as leituras experimentais na fase estacionária geraram dados muito dispersos e que a fase lag e a fase exponencial não foram bem definidas; de forma similar ao comportamento de *N. fischeri*. Estes problemas provavelmente ocorreram devido à dificuldade de homogeneizar perfeitamente a amostra antes da leitura. Este mesmo comportamento foi observado em outros seis ensaios.

Pode-se concluir que este método não é válido para medir o crescimento de fungos filamentosos em sucos, pois não gera dados confiáveis.

Hudson & Mott (1994) observaram que cerca da metade de seus experimentos geraram um aumento na densidade ótica durante a fase lag, enquanto a contagem de viáveis permaneceu constante. Os autores explicaram que este fenômeno não foi devido ao aumento no número de

células, mas particularmente devido ao aumento no volume celular. Eles observaram que o comportamento no crescimento é explicado por uma sensibilidade da população microbiana em condições de crescimento e pré-crescimento. Se este fenômeno não for levado em consideração durante a fase de modelagem, pode ocorrer uma superestimação da fase lag.

1.2. MEDIDA DE CRESCIMENTO POR PESO SECO

1.2.1. Crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi a 25°C e 30°C

As Figuras 4.3 e 4.4 mostram os dados experimentais de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi, incubado a 30°C e 25°C, respectivamente.

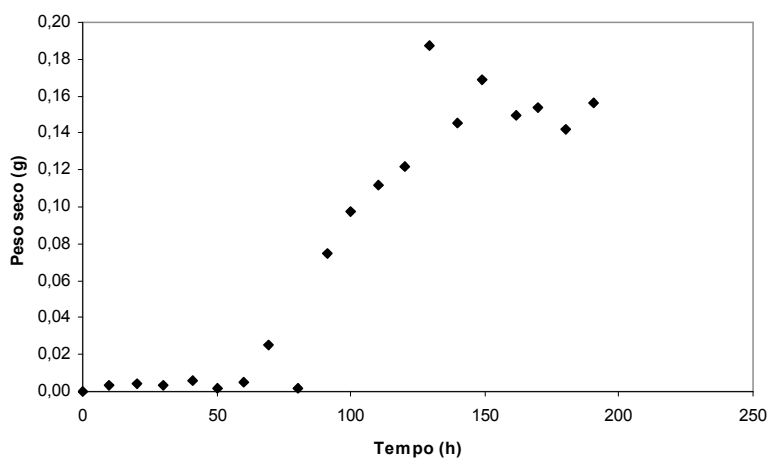


Figura 4.3. Dados experimentais de crescimento de *N. fischeri*, obtidos por filtração e peso seco, em suco de abacaxi incubado a 30°C.

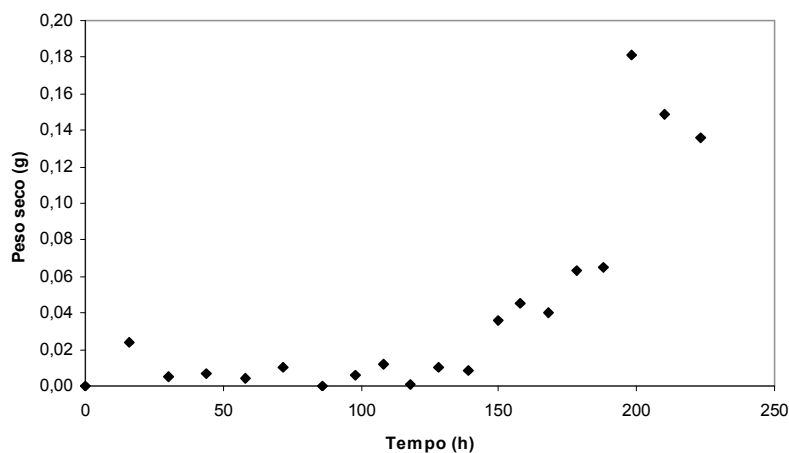


Figura 4.4. Dados experimentais de crescimento de *N. fischeri*, obtidos por filtração e peso seco, em suco de abacaxi incubado a 25°C.

Através da Figura 4.3, pode-se observar que as três fases do crescimento microbiano foram bem representadas; ou seja, houve um número adequado de pontos em cada fase, apesar de os dados estarem levemente dispersos. Entretanto na Figura 4.4, a duração da fase lag e a fase exponencial não foram bem definidas, quando comparadas com as curvas deste microrganismo medidas pelo método de acompanhamento do diâmetro (ver Figura 4.7), e não houve pontos suficientes na fase estacionária. Este problema foi observado devido à utilização da membrana Whatman nº1 durante todos os tempos do ensaio; resultando em um entupimento dos poros antes do final da filtração, devido ao aumento da densidade da colônia a partir do nono dia. Pode-se concluir que este método não é válido, nas condições estudadas, como expressão do crescimento de fungos filamentosos, por não gerar dados reprodutíveis.

De acordo com Langvad (1999), o crescimento de fungos filamentosos, em cultura líquida, pode ser medido através do aumento do peso seco de culturas realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL estacionários ou agitados. Akpomedaye & Ejechi (1998) estudaram o efeito de extratos de pimenta associado ao efeito do calor no crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer*, pela quantificação da biomassa, que foi filtrada e seca até peso constante; obtendo-se ótimos resultados. Erkmen & Alben (2002), avaliaram diferentes modelos não lineares para estimar os parâmetros μ (g/L), λ (dias) e A (g/L) na produção de ácido cítrico e na formação de biomassa por *Aspergillus niger* em cultura submersa. A biomassa foi quantificada por filtração de uma amostra de 15 mL retirada do fermentador a cada 15 dias. Após a filtração, o micélio foi seco a 105°C até peso constante. Os autores também encontraram resultados excelentes.

1.2.2. Crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi a 25°C e 30°C

As Figuras 4.5 e 4.6 apresentam os dados experimentais de crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi, incubado a 30°C e 25°C, respectivamente.

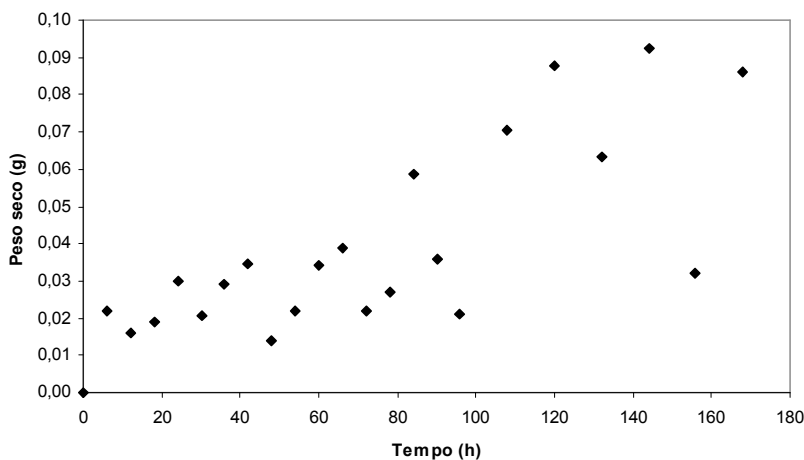


Figura 4.5. Dados experimentais de crescimento de *B. nivea*, obtidos por filtração e peso seco, em suco de abacaxi incubado a 30°C.

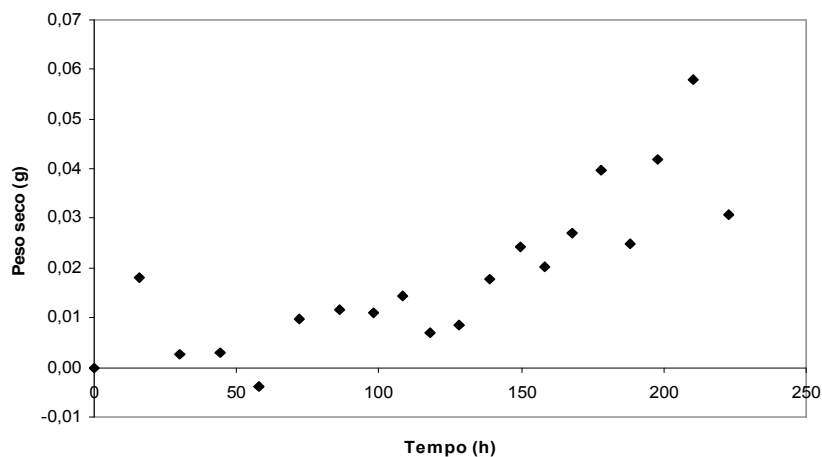


Figura 4.6. Dados experimentais de crescimento de *B. nivea*, obtidos por filtração e peso seco, em suco de abacaxi incubado a 25°C.

Pode-se observar nas Figuras 4.5 e 4.6 que não houve pontos bem distribuídos em cada fase. Dessa forma, este método não pode ser considerado como expressivo do crescimento de fungos filamentosos, por não gerar dados reprodutíveis.

Cunha (2003) utilizou o método da filtração para determinação do crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi e suco de maracujá a 20°C e 30°C. O autor observou que não houve uma fase lag característica de curvas de crescimento, porém as fases exponencial e estacionária foram bem definidas. Os parâmetros primários foram obtidos pelo modelo de Gompertz Modificado. A duração da fase lag (λ) foi de 53,46 horas, a velocidade de crescimento (μ) foi de 0,04 h⁻¹ e o aumento logarítmico da população (A) foi de 0,89 para crescimento em suco de abacaxi a 30°C.

1.3. MEDIDA DE CRESCIMENTO PELA MEDIDA DE DIÂMETRO DA COLÔNIA

1.3.1. Modelagem primária de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi a 22°C, 25°C e 28°C

A Figura 4.7 apresenta o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento, obtidos através da medida de diâmetro da colônia, de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi a 22°C, 25°C e 28°C.

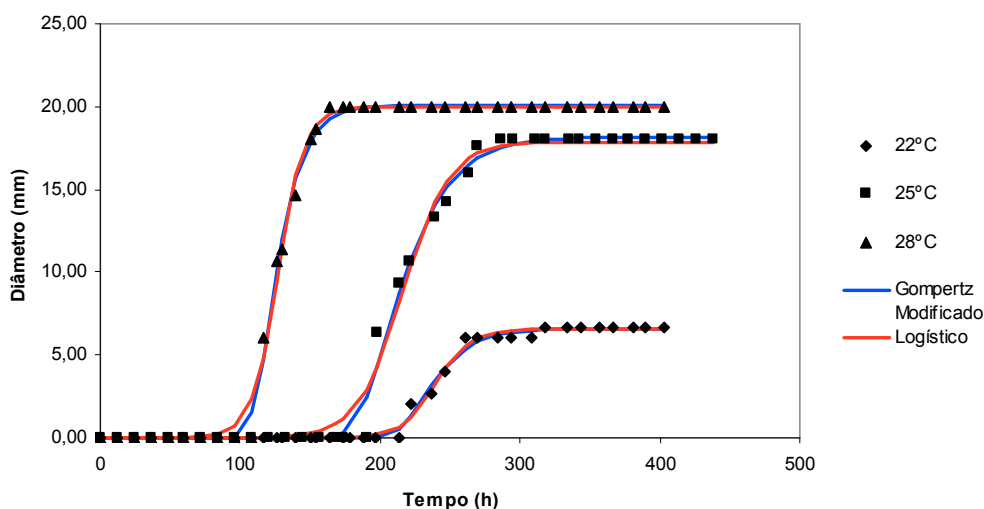


Figura 4.7. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados de crescimento de *N. fischeri*, obtidos por medida do diâmetro, em suco de abacaxi incubado a 22°C, 25°C e 28°C.

A Tabela 4.1 mostra os parâmetros obtidos pelo ajuste dos modelos de Gompertz Modificado (Equação 3.2) e Logístico (Equação 3.3); bem como os valores do coeficiente de correlação (r^2).

Tabela 4.1. Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico para *N. fischeri* a 22°C, 25°C e 28°C.

Temperatura	Modelo	λ (h)	μ_{\max} (mm/h)	A (mm)	r^2
22°C	Gompertz Modificado	212,2	0,13	6,6	0,9972
	Logístico	215,5	0,14	6,5	0,9970
25°C	Gompertz Modificado	182,7	0,28	18,2	0,9965
	Logístico	184,4	0,28	17,8	0,9945
28°C	Gompertz Modificado	107,4	0,54	20,1	0,9987
	Logístico	107,9	0,52	20,0	0,9978

O método de medida do diâmetro da colônia se mostrou uma ótima ferramenta para quantificar o crescimento de fungos filamentosos termorresistentes.

Como é possível observar na Figura 4.7, os modelos de Gompertz Modificado e Logístico se ajustaram muito bem aos dados experimentais. A Tabela 4.1 confirma esta análise, uma vez que os valores encontrados para r^2 foram superiores a 0,99; porém o modelo de Gompertz Modificado se ajustou um pouco melhor nas três temperaturas estudadas.

De acordo com Gibson & Hocking (1997), a avaliação do crescimento de fungos pela medida da taxa de crescimento radial é, provavelmente, a medida mais simples e direta, mas não necessariamente representa a verdadeira natureza do crescimento do fungo. Todavia, este método de medidas de diâmetro da colônia tem sido bastante utilizado para quantificar o crescimento de fungos, como o estudo realizado por Molina & Giannuzzi (1999), que avaliaram o efeito da combinação de temperatura e de concentrações de ácido propiônico no crescimento de *Aspergillus parasiticus*; e o estudo realizado por Valík & Piecková (2001) que determinaram o efeito da atividade de água no crescimento de *Byssoschlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* e *Talaromyces avellaneus*.

Outra observação importante (Figura 4.7) é que houve um aumento da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e do diâmetro máximo atingido pela colônia (A) e uma diminuição da fase de adaptação (λ) com o aumento da temperatura, dentro da faixa estudada, perto da região de temperatura ótima do fungo.

O mesmo aumento da taxa de crescimento com a temperatura, foi observado por Samapundo et al. (2005) trabalhando com *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* em milho estocado entre 15°C e 30°C.

De acordo com Buchanan & Cygnarowicz (1990), McMeekin et al. (1993) e Augustin et al. (2000), os fatores que afetam a duração da fase lag são as mudanças nas condições ambientais, o estágio do crescimento ou história fisiológica das células e o tamanho do inóculo.

1.3.2. Modelagem primária do crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi a 22°C, 25°C e 28°C

A Figura 4.8 mostra o ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento, obtidos através da medida de diâmetro da colônia, de *B. nivea* em suco de abacaxi incubado a 22°C, 25°C e 28°C.

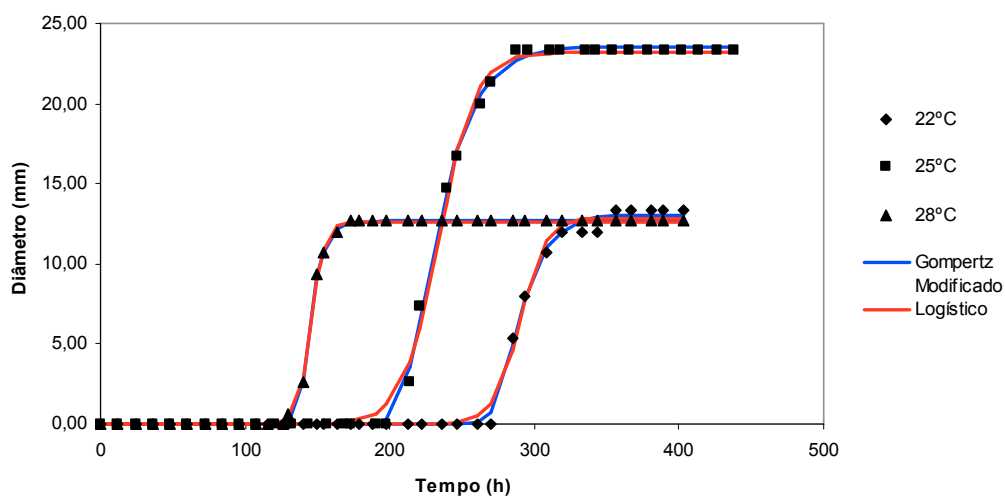


Figura 4.8. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados de crescimento de *B. nivea*, obtidos por medida do diâmetro, em suco de abacaxi incubado a 22°C, 25°C e 28°C.

A Tabela 4.2 mostra os parâmetros obtidos pelos modelos de Gompertz Modificado e Logístico, bem como os valores do coeficiente de correlação (r^2).

Tabela 4.2. Parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico para *B. nivea* a 22°C, 25°C e 28°C.

Temperatura	Modelo	λ (h)	μ_{\max} (mm/h)	A (mm)	r^2
22°C	Gompertz Modificado	270,1	0,35	13,0	0,9988
	Logístico	271,6	0,36	12,9	0,9975
25°C	Gompertz Modificado	207,2	0,47	23,6	0,9995
	Logístico	209,1	0,46	23,2	0,9987
28°C	Gompertz Modificado	136,4	0,74	12,7	0,9998
	Logístico	136,5	0,69	12,6	0,9998

Como é possível observar na Figura 4.8, os modelos de Gompertz Modificado e Logístico se ajustaram muito bem aos dados experimentais. Com a leitura da Tabela 4.2, pode-se confirmar esta análise, uma vez que os valores encontrados para r^2 foram muito próximos de 1. O Modelo de Gompertz Modificado se ajustou melhor nas temperaturas de 22°C e 25°C e na temperatura de 28°C, os dois modelos apresentaram r^2 idênticos.

O método de medida do diâmetro da colônia, assim como para *N. fischeri*, se mostrou uma ferramenta eficaz para quantificar o crescimento de *B. nivea*.

López-Malo et al. (2005) utilizaram a taxa de crescimento radial para avaliação do crescimento de *Aspergillus flavus* em meio PDA sob o efeito combinado de atividade de água, pH e agentes antimicrobianos; e Gibson et al. (1994), medindo o diâmetro da colônia, avaliaram o efeito da atividade de água no crescimento de *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus* e *A. nomius* em meios contendo glicose e frutose. Os autores encontraram que a medida do diâmetro foi uma maneira válida para expressar o crescimento dos fungos estudados.

Também utilizando a medida do diâmetro da colônia, Cuppers et al. (1997) desenvolveram um modelo com a taxa de crescimento em função da temperatura e da concentração de sal, para prever o tempo necessário para que a colônia atinja um tamanho visível (3 mm); e Baranyi et al. (1996) modelaram o efeito da atividade de água na taxa de crescimento da colônia de quatro espécies de *Aspergillus*. Taniwaki et al. (2001) utilizaram o crescimento radial para modelar o crescimento de oito espécies de fungos, dentre eles o *Byssoschlamys nivea*, sob efeito de diferentes concentrações de oxigênio.

Outra observação a respeito da Figura 4.8 é que houve um aumento da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e uma diminuição da fase de adaptação (λ) com o aumento da temperatura. O parâmetro diâmetro máximo atingido pela colônia (A) não apresentou uma relação linear com a temperatura, que aumentou de 22°C para 25°C e diminuiu de 25°C para 28°C; mostrando um comportamento diferente dos outros parâmetros observados para este fungo e também diferente do que foi observado para *N. fischeri* (Figura 4.7).

Cunha (2003), em pesquisa realizada sobre o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, observou que a duração da fase lag diminuiu, a velocidade específica máxima de crescimento aumentou e A aumentou com o aumento da temperatura de estocagem do suco.

2. EFEITO DA TEMPERATURA DE ESTOCAGEM DO SUCO NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS TERMORRESISTENTES

2.1. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE ABACAXI - MODELAGEM SECUNDÁRIA

No presente estudo, foi avaliado o crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi a 22°C, 25°C e 28°C. Na modelagem primária (em função do tempo de incubação), foram ajustados os modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento (item 1.3.1). Como o modelo de Gompertz Modificado representou melhor os dados experimentais, somente os parâmetros obtidos por este modelo foram ajustados em função da temperatura pelo Modelo da Raiz Quadrada ou modelo de Ratkowsky (Equação 3.6).

As Figuras 4.9(a), 4.9(b) e 4.9(c) mostram como os parâmetros \sqrt{A} , $\sqrt{\mu_{\max}}$ e $\sqrt{\lambda}$ variam com a temperatura, respectivamente.

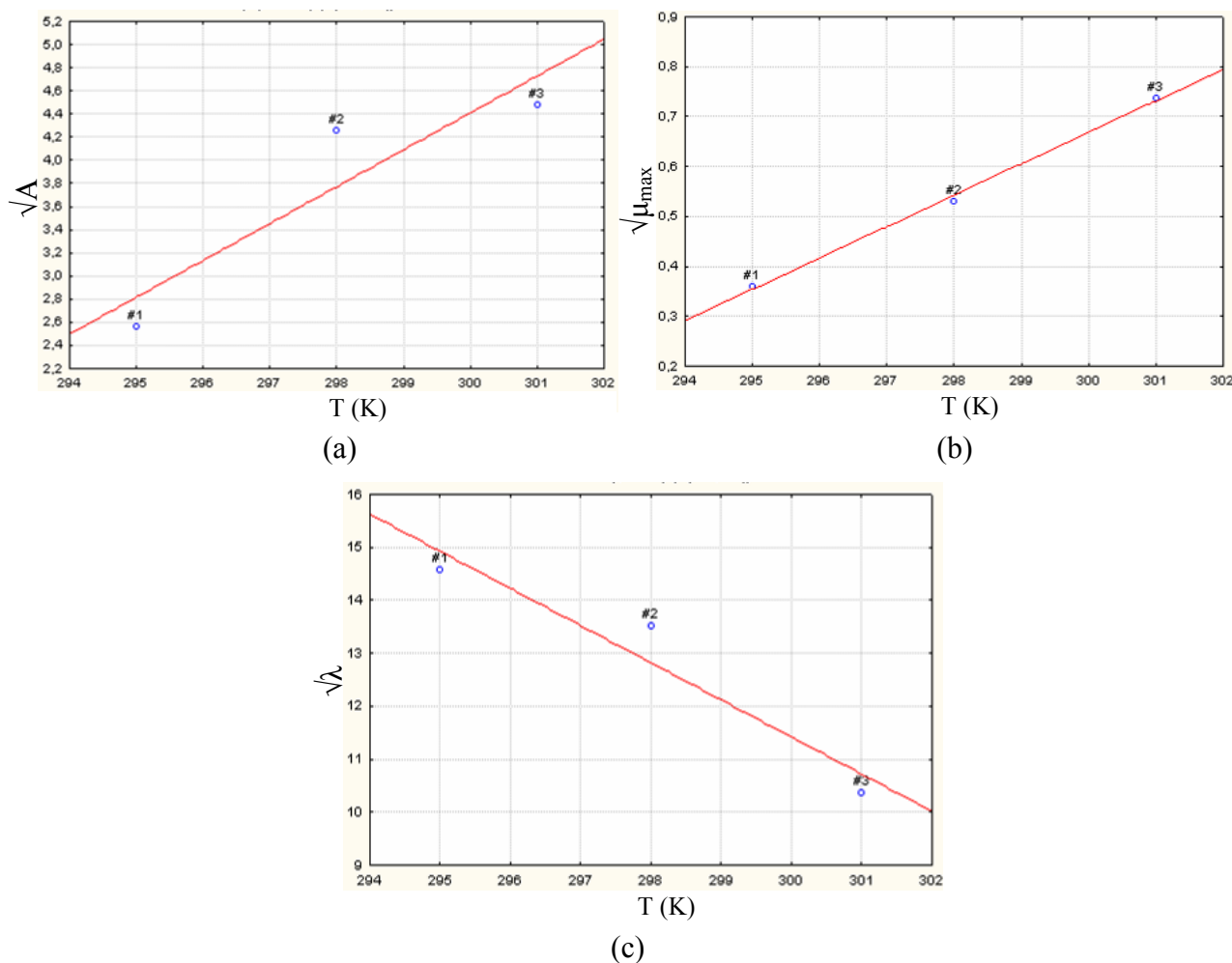


Figura 4.9. Relação entre (a) \sqrt{A} , (b) $\sqrt{\mu_{\max}}$, (c) $\sqrt{\lambda}$ e a temperatura para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Os valores do coeficiente de correlação (r^2) obtidos pelo ajuste do modelo da Raiz Quadrada aos dados experimentais estão descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Valores de r^2 para verificar o ajuste do Modelo da Raiz Quadrada para crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

	A	μ_{\max}	λ
r^2	0,914080	0,998307	0,960825

Pela análise da Tabela 4.3, pode-se concluir que o Modelo da Raiz Quadrada se ajustou bem aos dados experimentais na faixa estudada; uma vez que os valores de r^2 foram elevados.

Considerando a estocagem do suco a temperatura ambiente, a faixa de temperatura do estudo foi escolhida por ser próxima a ótima de crescimento do fungo (30-36°C, Tournas, 1989) e por ser uma região com facilidade de modelagem; abaixo de 22°C o crescimento é muito lento e acima de 28°C a fase exponencial é rápida demais para medir.

Através da Figura 4.9(a), pode-se notar que, com o aumento da temperatura de crescimento, houve um aumento no diâmetro máximo atingido pela colônia. Com relação à velocidade específica máxima de crescimento (Figura 4.9(b)), pode-se perceber que o aumento da temperatura leva a um aumento do valor deste parâmetro, dentro da faixa testada (22-28°C). Analisando a duração da fase de adaptação, Figura 4.9(c), nota-se que existe uma relação inversa com a temperatura de estocagem.

O efeito da temperatura de crescimento no diâmetro máximo atingido pela colônia é dado pela Equação 4.1.

$$\sqrt{A} = 0,318699(T - (286,169)) \quad (4.1)$$

O efeito da temperatura de crescimento na velocidade específica máxima de crescimento é dado pela Equação 4.2.

$$\sqrt{\mu_{\max}} = 0,062939(T - (289,383)) \quad (4.2)$$

O efeito da temperatura de crescimento na duração da fase de adaptação é dado pela Equação 4.3.

$$\sqrt{\lambda} = (-0,70117)(T - (316,277)) \quad (4.3)$$

Através do ajuste do modelo (Equação 4.1), foi encontrado o valor de T_{min} de 286,17K (13,17°C), ou seja, nesta temperatura o diâmetro máximo atingido pela colônia seria zero.

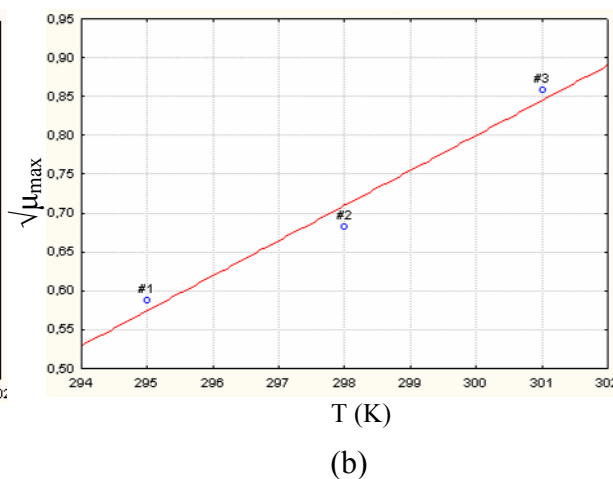
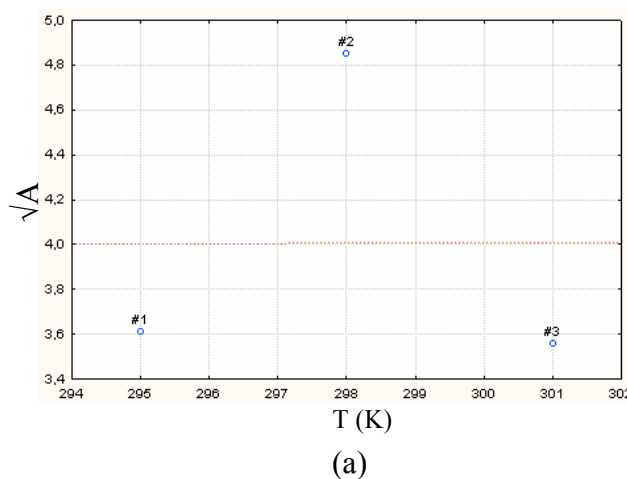
Pela Equação 4.2, o valor encontrado para T_{min} foi de 289,38K (16,38°C), sendo esta a temperatura onde a velocidade específica máxima de crescimento seria nula, nas condições estudadas. Tournas (1994) obteve que a temperatura mínima de crescimento de *N. fischeri* é 10°C.

Por outro lado, através da Equação 4.3, o valor de T_{min} encontrado foi de 316,28K (43,28°C), representando, neste caso, a temperatura onde a duração da fase de adaptação seria nula, ou seja, o fungo entraria direto na fase exponencial. De acordo com Nielsen et al. (1989), o fungo *N. fischeri* cresce em uma faixa de temperatura de 10°C a 52°C, sendo de 26°C a 45°C sua faixa ótima. Tournas (1994) reportou que a temperatura ótima de crescimento está entre 30°C e 36°C.

2.2. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO DE *Byssoschlamys nivea* EM SUCO DE ABACAXI - MODELAGEM SECUNDÁRIA

No presente estudo, foi avaliado o crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi a 22°C, 25°C e 28°C. Na modelagem primária (em função do tempo de incubação), foram ajustados os modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento (item 1.3.2). Como o modelo de Gompertz Modificado se ajustou melhor aos dados experimentais, somente os parâmetros obtidos por este modelo foram ajustados em função da temperatura pelo Modelo da Raiz Quadrada ou de Ratkowsky (Equação 3.6).

As Figuras 4.10(a), 4.10(b) e 4.10(c) mostram como os parâmetros \sqrt{A} , $\sqrt{\mu_{max}}$ e $\sqrt{\lambda}$ variam com a temperatura, respectivamente.



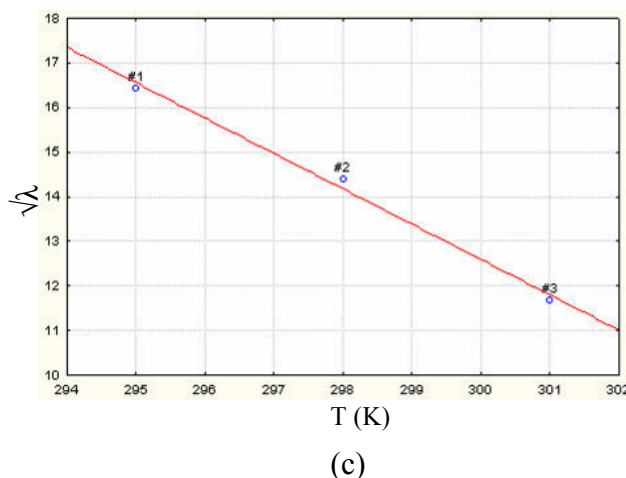


Figura 4.10. Relação entre (a) \sqrt{A} , (b) $\sqrt{\mu_{\max}}$, (c) $\sqrt{\lambda}$ e a temperatura para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Os valores do coeficiente de correlação (r^2) obtidos pelo ajuste do modelo da Raiz Quadrada aos dados experimentais estão descritos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Valores de r^2 para verificar o ajuste do Modelo da Raiz Quadrada para crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

	A	μ_{\max}	λ
r^2	não ajustou	0,985099	0,996648

Pela análise da Tabela 4.4, pode-se concluir que o Modelo da Raiz Quadrada se ajustou bem aos dados experimentais para os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e duração da fase de adaptação (λ); uma vez que os valores de r^2 foram elevados. Entretanto para o diâmetro máximo atingido pela colônia, não houve ajuste do modelo.

Através da Figura 4.10(a), pode-se notar que, com o aumento da temperatura de crescimento, não houve uma relação linear com o diâmetro máximo atingido pela colônia. O aumento da temperatura levou a um aumento do número de colônias, resultando em uma área superficial menor para o fungo se desenvolver. Este fato gerou uma limitação no diâmetro máximo atingido por cada colônia, motivo pelo qual este parâmetro diminuiu a 28°C.

Com relação à velocidade específica máxima de crescimento (Figura 4.10(b)), pode-se perceber que o aumento da temperatura leva a um aumento do valor deste parâmetro. E,

analisando-se a duração da fase de adaptação, Figura 4.10(c), ao aumentar a temperatura, este parâmetro diminui perto da região de temperatura ótima.

O efeito da temperatura de crescimento na velocidade específica máxima de crescimento é dado pela Equação 4.4.

$$\sqrt{\mu_{\max}} = 0,045077(T - (282,263)) \quad (4.4)$$

O efeito da temperatura de crescimento na duração da fase de adaptação é dado pela Equação 4.5.

$$\sqrt{\lambda} = (-0,79274)(T - (315,875)) \quad (4.5)$$

Através do ajuste do modelo (Equação 4.4), foi encontrado o valor de T_{min} de 282,26K (9,26°C), sendo a temperatura onde a velocidade específica máxima de crescimento seria nula. Estes dados estão de acordo com Hull (1939), que encontrou que a temperatura mínima para crescimento de *B. nivea* é 8°C.

Por outro lado, através da Equação 4.5, o valor de T_{min} encontrado foi de 315,88K (42,88°C), representando, neste caso, a temperatura onde a duração da fase de adaptação seria nula, nas condições estudadas; ou seja, o crescimento do fungo entraria direto na fase exponencial. De acordo com Tournas (1994) e Olliver & Rendle (1934), a temperatura ótima de crescimento de *Byssochlamys nivea* está entre 30°C e 37°C; havendo crescimento acima e abaixo desses valores.

3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, *RATIO* E ESPAÇO LIVRE DA GARRAFA NO CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE ABACAXI

A partir do planejamento experimental mostrado na Tabela 3.1, foram realizados 11 ensaios com quatro réplicas cada um. Entre as quatro réplicas foram selecionadas duas para a análise estatística do efeito dos fatores ambientais, pois, a partir da análise de variância ANOVA, detectou-se que houve diferença significativa entre as quatro réplicas para cada ensaio. O critério

de escolha das réplicas foi: a curva na qual o fungo apresentou a menor fase de adaptação e a curva na qual o fungo apresentou a segunda menor fase de adaptação, representando a situação de maior risco para a indústria; uma vez que o produto é condenado quando o fungo se torna visível. As curvas de crescimento em função do tempo dos ensaios 1 ao 11 estão no Apêndice I.A.

A Tabela 4.5 mostra que houve diferença significativa entre as réplicas ($p < 0,05$) para os parâmetros duração da fase de adaptação (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e diâmetro máximo atingido pela colônia (A).

Tabela 4.5. Análise estatística da diferença entre as réplicas para os parâmetros λ , μ_{\max} e A no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
λ	129,83	3	43,28	7,079	0,044532
μ_{\max}	0,036540	3	0,012180	29,254	0,003511
A	1266,50	3	422,17	194,388	0,000087

A diferença entre as réplicas pode ser explicada pelo fato de haver só um operador para enxaguar as garrafas após o tempo de contato com o sanitizante ácido peracético P3 Oxônia ativo 150 (Ecolab); resultando em um tempo maior de contato para as últimas garrafas, podendo levar a um residual maior de ácido nas mesmas. As outras condições de trabalho foram muito bem controladas.

A Tabela 4.6 mostra que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre os modelos primários de Gompertz Modificado e Logístico utilizados no ajuste aos dados experimentais para os parâmetros λ , μ_{\max} e A.

Tabela 4.6. Análise estatística da diferença entre os modelos para os parâmetros λ , μ_{\max} e A no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
λ	18,27	1	18,27	0,806	0,403890
μ_{\max}	0,001090	1	0,001090	0,1763	0,689209
A	3,67	1	3,67	0,01733	0,899577

3.1. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO E DO MODELO LOGÍSTICO

A Tabela 4.7 apresenta os parâmetros estatísticos para avaliar o ajuste dos dois modelos primários empregados. São mostrados neste item apenas os valores para a primeira réplica escolhida para cada ensaio. Os valores para a segunda réplica se encontram no Apêndice II.A.

Tabela 4.7. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Ensaio	Modelo	r^2	MSE	Bias	Exatidão
1	Gompertz	0,9906	0,61425	1,0124	1,0313
	Logístico	0,9838	1,06319	1,0164	1,0420
2	Gompertz	0,9979	0,07783	1,0040	1,0155
	Logístico	0,9955	0,16557	1,0034	1,0222
3	Gompertz	0,9961	1,06438	1,0185	1,0412
	Logístico	0,9952	1,25493	1,0230	1,0372
4	Gompertz	0,9959	0,06865	1,0063	1,0270
	Logístico	0,9961	0,06429	1,0123	1,0246
5	Gompertz	0,9857	0,28280	1,0161	1,0403
	Logístico	0,9783	0,4307	1,0220	1,0500
6	Gompertz	0,9941	0,32452	1,0086	1,0196
	Logístico	0,9900	0,54624	1,0127	1,0251
7	Gompertz	0,9964	0,77243	1,0094	1,0331
	Logístico	0,9959	0,88863	1,0162	1,0268
8	Gompertz	0,9820	3,46119	1,0663	1,1514
	Logístico	0,9883	2,16843	1,0629	1,1202
9	Gompertz	0,9977	0,24907	1,0043	1,0309
	Logístico	0,9952	0,51483	1,0006	1,0258
10	Gompertz	0,9913	1,6535	0,9941	1,0588
	Logístico	0,9885	2,12207	0,9936	1,0709
11	Gompertz	0,9991	0,15367	0,9881	1,0312
	Logístico	0,9975	0,42363	0,9767	1,0556

*Os valores em negrito indicam o modelo de melhor ajuste.

Como se pode observar pela análise da Tabela 4.7, os dois modelos se ajustaram bem aos dados experimentais, com pequenas diferenças. Os valores do modelo melhor ajustado para cada ensaio foram destacados em negrito. O Modelo de Gompertz Modificado se ajustou melhor na maioria dos ensaios realizados (9 de 11 ensaios); visto que o r^2 foi mais próximo de 1, o MSE mais

próximo de zero e o Fator Bias e o Fator de Exatidão mais próximos de 1. Assim como para a primeira réplica, os dois modelos se ajustaram bem aos dados experimentais para a segunda réplica, entretanto, o Modelo Logístico teve um ajuste ligeiramente superior ao Modelo de Gompertz Modificado na maioria dos ensaios realizados (6 de 11 ensaios) (ver Apêndice II.A).

Para melhor visualização da qualidade dos ajustes, estão apresentados nas Figuras 4.11(a) e 4.11(b), os valores do diâmetro observados experimentalmente contra os valores preditos pelos modelos de Gompertz Modificado e Logístico, respectivamente. O Ensaio 11 foi escolhido aleatoriamente para a representação.

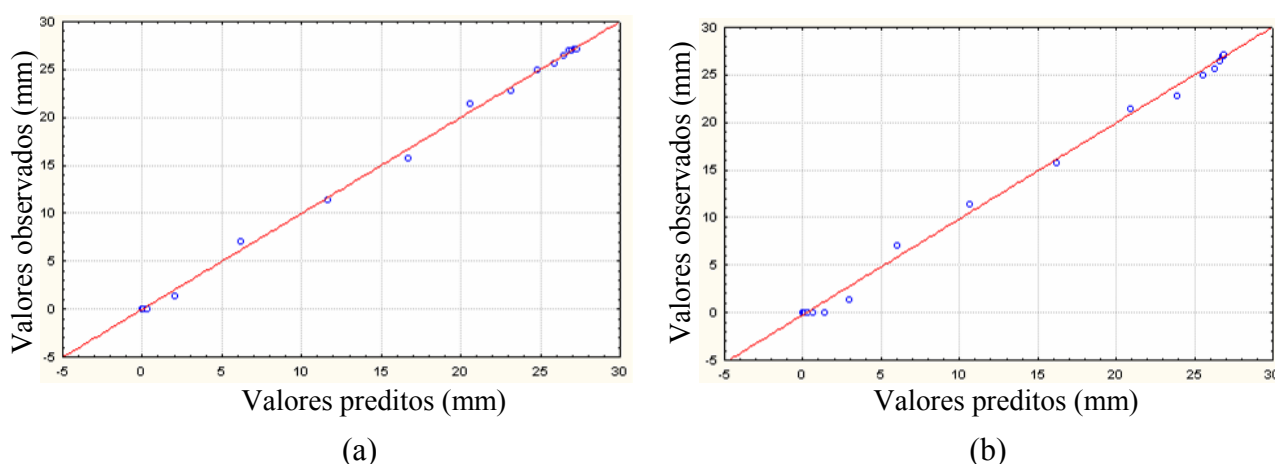


Figura 4.11. Valores de diâmetro observados versus valores de diâmetro preditos pelos modelos de Gompertz Modificado (a) e Logístico (b) para crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

As Figuras 4.11(a) e 4.11(b) mostram que os dados estão bem distribuídos na linha de equivalência, logo os dois modelos descreveram bem o crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

3.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE ABACAXI

A Tabela 4.8 apresenta os parâmetros primários de crescimento (λ , μ_{\max} e A) e o tempo necessário para a colônia de *N. fischeri* atingir 3 mm e se tornar visível, calculados pelo modelo de melhor ajuste em cada ensaio.

O tempo para a colônia atingir 3 mm é um parâmetro que leva em consideração a duração da fase de adaptação (lag) e a velocidade de crescimento do fungo. Segundo Gibson et al. (1994), o tempo no qual a colônia atinge 3 mm de diâmetro deve ser calculado, pois uma colônia de 3 mm é visível a olho nu e conseqüentemente o produto é rejeitado pelo consumidor.

Tabela 4.8. Parâmetros primários obtidos pelo modelo de melhor ajuste no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Ensaio	Réplica	λ (h)	μ_{\max} (mm/h)	A (mm)	Tempo para atingir 3 mm (h)
1	Réplica 1	178,9	0,18	17,5	194,7
	Réplica 2	296,3	0,52	33,2	291,3
2	Réplica 3	208,6	0,16	14,2	226,8
	Réplica 2	240,7	0,29	22,8	242,9
3	Réplica 1	75,5	0,49	35,7	78,0
	Réplica 2	97,5	0,54	38,5	89,2
4	Réplica 2	149,5	0,26	9,3	160,6
	Réplica 3	219,5	0,64	22,9	220,5
5	Réplica 2	159,1	0,13	10,8	182,6
	Réplica 4	174,8	0,32	21,4	177,9
6	Réplica 1	260,3	0,29	19,2	269,5
	Réplica 2	381,7	0,14	17,5	402,3
7	Réplica 2	74,1	0,69	29,8	76,8
	Réplica 1	83,0	0,65	32,8	85,3
8	Réplica 1	112,6	0,35	33,3	105,2
	Réplica 2	116,4	0,37	30,0	112,4
9	Réplica 2	126,5	0,38	22,4	133,0
	Réplica 4	138,4	0,46	27,4	142,9
10	Réplica 1	126,0	0,34	32,7	130,5
	Réplica 2	131,2	0,47	30,9	134,9
11	Réplica 1	106,9	0,46	27,3	111,4
	Réplica 2	116,3	0,51	41,2	117,4

No Ensaio 6, réplica 2, ocorreu o maior tempo de adaptação (381,7 horas), nas condições de maior temperatura de formação dos esporos, menor temperatura de crescimento, maior *ratio* e menor espaço livre. Por outro lado, o menor tempo de adaptação (74,1 horas), se deu no Ensaio 7, réplica 2, nas condições de menor temperatura de formação dos esporos, maior temperatura de crescimento, maior *ratio* e o espaço livre mais baixo. Foi também no Ensaio 7, que ocorreu o menor tempo para a colônia atingir 3 mm, 76,8 horas, isso significa que em 3,2 dias o produto seria rejeitado pelo consumidor se estocado nestas condições.

É importante notar que a proximidade entre a temperatura de formação dos esporos e a temperatura de crescimento favorece o desenvolvimento do fungo. O espaço livre parece não ser importante para o tempo de adaptação, na faixa estudada. Cabe ressaltar que o método necessita do uso de uma superfície grande para observar o crescimento, portanto foi necessário o uso de espaços livres elevados. O *ratio* elevado parece contribuir para o crescimento do fungo.

A Figura 4.12 apresenta uma comparação entre os ensaios de maior e menor tempo de adaptação.

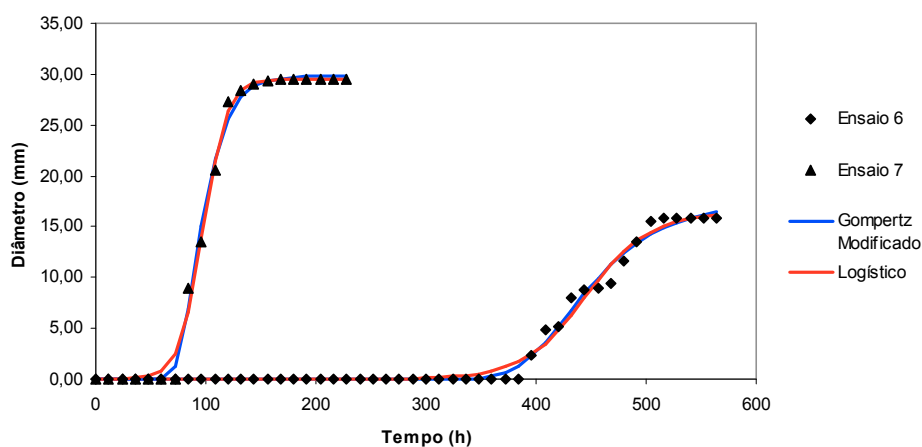


Figura 4.12. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o maior (6) e o menor (7) tempo de adaptação para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Com relação à velocidade específica máxima de crescimento, o Ensaio 5 apresentou o menor valor. Nesse Ensaio, a temperatura de formação dos esporos foi 25°C, a temperatura de crescimento 22°C, o *ratio* 38 e o espaço livre 28%. A maior velocidade específica máxima de crescimento foi observada no Ensaio 7, o mesmo que apresentou o menor λ . O espaço livre parece afetar o valor de μ_{\max} e a temperatura de estocagem também.

A Figura 4.13 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento de *N. fischeri* correspondentes aos ensaios de maior e menor velocidade específica máxima de crescimento.

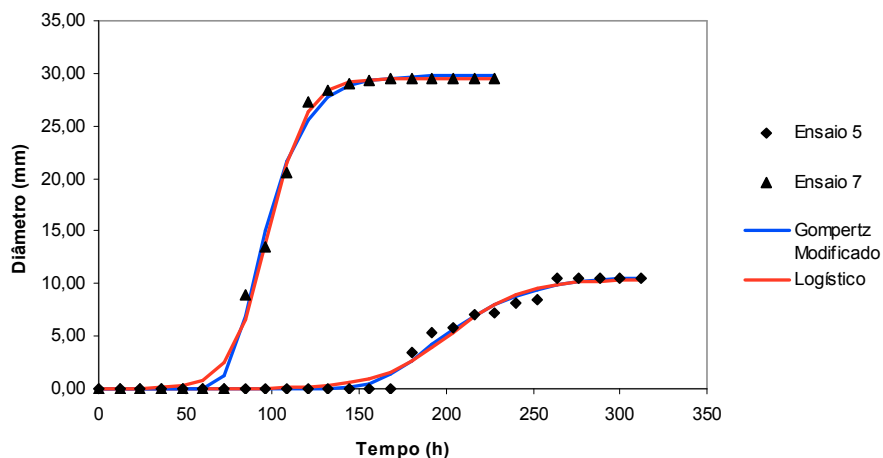


Figura 4.13. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram a menor (5) e a maior (7) velocidade específica máxima de crescimento para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

O maior diâmetro máximo atingido pela colônia, ocorreu no Ensaio 11, ou seja na condição central do planejamento; onde as condições são mais favoráveis para o desenvolvimento do fungo. O menor diâmetro máximo atingido pela colônia ocorreu no Ensaio 4, no qual a temperatura de formação dos esporos era 35°C, a temperatura de crescimento 28°C, *ratio* 10 e o espaço livre 8%.

A Figura 4.14 apresenta uma comparação das curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor diâmetro máximo atingido pela colônia.

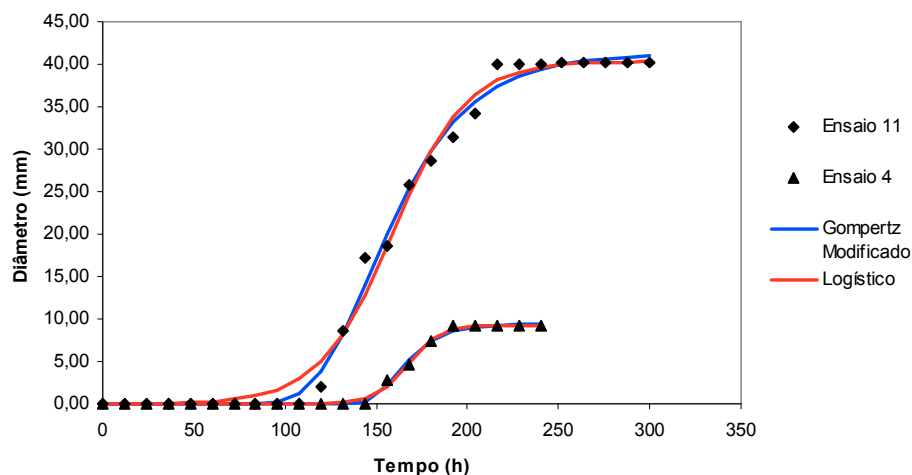


Figura 4.14. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o menor (4) e o maior (11) diâmetro máximo atingido pela colônia para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

O Ensaio 7 foi que o que apresentou as melhores condições para o crescimento de *Neosartorya fischeri*, uma vez que, foi neste ensaio, que se obteve o menor tempo de adaptação e a maior velocidade específica máxima de crescimento.

Esta é apenas uma avaliação preliminar dos resultados, estes serão analisados mais profundamente durante a análise estatística do planejamento experimental exploratório.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO

Esta análise teve a finalidade de esclarecer quais foram os fatores, entre os quatro estudados, que afetaram significativamente os parâmetros de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de abacaxi. Como o desenho experimental foi apenas exploratório, não foi possível estabelecer nenhum modelo secundário para os parâmetros analisados. A análise foi realizada no *software* Statistica 6.0, utilizando-se o desenho experimental (estimativa dos parâmetros) e como variável resposta os valores de λ , μ_{\max} e A .

Antes da análise estatística, foi feito um estudo preliminar para avaliar, dentro de um ensaio escolhido aleatoriamente, qual parâmetro (λ , μ_{\max} ou A) entre as réplicas, tinha maior variabilidade. Este estudo foi feito desconsiderando-se os modelos. Calculou-se o desvio padrão, a média, o intervalo de confiança e o coeficiente de variação (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação para as variáveis resposta λ , μ_{\max} e A das quatro repetições no Ensaio 7 (escolhido aleatoriamente) para crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

	Média	Desvio Padrão	Intervalo de confiança (-95%)	Intervalo de confiança (+95%)	Coeficiente de Variação *
λ	82,1 h	4,7	78,1 h	86,0 h	5,7%
μ_{\max}	0,70 mm/h	0,07	0,64 mm/h	0,76 mm/h	10%
A	39,8 mm	13,5	28,5 mm	51,0 mm	33,9%

*Coeficiente de Variação = (Desvio Padrão/Média)*100.

Pode-se concluir pela Tabela 4.9 que, os valores de λ , estão mais concentrados em torno da média (relação entre desvio padrão e média é igual a 5,7%). Por outro lado, os valores de A, possuem uma dispersão maior, onde essa relação é de 33,9%. Erros de observação pelo operador e a escala de conversão da lupa podem ser as possíveis explicações para este fato.

3.3.1. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em λ para crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi

Na Tabela 4.10, apresenta-se o desenho experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 ; trata-se da primeira e segunda réplica das quatro realizadas por ensaio.

Tabela 4.10. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Ensaio	T _e	T	R	HS	λ_1 (h)	λ_2 (h)
1	-1	-1	-1	-1	178,9	296,3
2	+1	-1	-1	+1	208,6	240,7
3	-1	+1	-1	+1	75,5	97,5
4	+1	+1	-1	-1	149,5	219,5
5	-1	-1	+1	+1	159,1	174,8
6	+1	-1	+1	-1	260,3	381,7
7	-1	+1	+1	-1	74,1	83,0
8	+1	+1	+1	+1	112,6	116,4
9	0	0	0	0	126,5	138,4
10	0	0	0	0	126,0	131,2
11	0	0	0	0	106,9	116,3

Na Tabela 4.11, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em relação a λ_1 . O coeficiente de correlação (r^2) não foi inserido, pois não estava sendo avaliada a qualidade do ajuste do modelo e sim, quais foram os efeitos significativos.

Tabela 4.11. Efeitos estimados para os fatores independentes e o valor de probabilidade em λ_1 para crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	143,6630	10,03483	14,31644	0,000007	119,109	168,2174
(1)T _e	77,7943	20,12941	3,86471	0,008317	28,539	127,0492
(2)T	-81,8157	20,12941	-4,06449	0,006617	-131,071	-32,5608
(3)R	15,3943	20,12941	0,76477	0,473407	-33,861	64,6492
(4)HS	-9,7657	20,12941	-0,48515	0,644777	-59,021	39,4892

*IC = Intervalo de Confiança

A 95% de significância, a temperatura de formação dos esporos (T_e) e a temperatura de crescimento (T) se mostraram significativas ($p < 0,05$). Estes resultados foram verificados pelo Teste de Pareto, que indica o parâmetro T como o mais significativo (Figura 4.15).

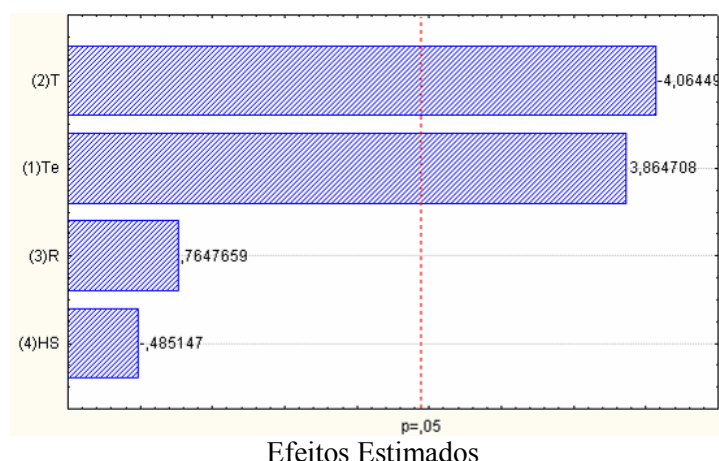


Figura 4.15. Gráfico de Pareto dos efeitos para a variável λ_1 para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

A Tabela 4.12 mostra os efeitos estimados para os fatores T_e e T obtidos ao ignorar os fatores não significativos (R e HS) e o valor de probabilidade.

Tabela 4.12. Efeitos estimados para T_e e T para a variável λ_1 no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	144,1917	11,67029	12,35545	0,000002	117,2799	171,1034
(1) T_e	0,7722	0,17634	4,37892	0,002352	0,3655	1,1788
(2) T	-0,7926	0,17634	-4,49487	0,002016	-1,1993	-0,3860

*IC = Intervalo de Confiança

Pode-se concluir que a temperatura de crescimento tem um efeito negativo no parâmetro λ , ou seja, a medida que a temperatura aumenta, dentro da faixa testada, a duração da fase de adaptação diminui, pois o ambiente se torna favorável para o crescimento até atingir a temperatura ótima. Por outro lado, a temperatura de formação dos esporos, exerce um efeito positivo, ou seja, a medida que ela aumenta, dentro da faixa testada, também aumenta o tempo de adaptação. Isso significa uma fase de latência maior para o fungo.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para λ_2 na Tabela 4.10).

Na Tabela 4.13, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes.

Tabela 4.13. Efeitos estimados para os fatores independentes para λ_2 no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	179,829	24,75027	7,26576	0,000346	119,268	240,3911
(1)T _e	118,662	49,64792	2,39007	0,054021	-2,822	240,1459
(2)T	-102,303	49,64792	-2,06057	0,084989	-223,787	19,1809
(3)R	17,437	49,64792	0,35121	0,737434	-104,047	138,9209
(4)HS	-45,768	49,64792	-0,92185	0,392165	-167,252	75,7159

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância.

A Tabela 4.14 mostra os efeitos estimados e os valores de probabilidade para os fatores T_e e T obtidos ao ignorar os menores fatores não significativos (R e HS).

Tabela 4.14. Efeitos estimados para T_e e T e valor de probabilidade para a variável resposta λ_2 para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	179,0720	29,14645	6,14387	0,000276	111,8602	246,2838
(1)T _e	1,1156	0,44041	2,53307	0,035087	0,1000	2,1312
(2)T	-1,0507	0,44041	-2,38583	0,044142	-2,0663	-0,0352

*IC = Intervalo de Confiança

Estes resultados confirmam a análise da primeira réplica, mostrando que a temperatura de formação dos esporos e a temperatura de crescimento do fungo realmente influenciam na duração da fase de adaptação.

Segundo Vindelov & Arneborg (2002), que estudaram o efeito da temperatura no crescimento de bolores (*Wallemia sebi*), a duração da fase de adaptação passou de 23 dias a 10°C para 3 dias a 20°C em meio contendo açúcar branco.

3.3.2. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em μ_{\max} para crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi

Na Tabela 4.15, apresenta-se o planejamento experimental codificado e a variável resposta $\mu_{\max1}$ (primeira réplica) e $\mu_{\max2}$ (segunda réplica).

Tabela 4.15. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max1}$ e $\mu_{\max2}$ para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Ensaio	T_e	T	R	HS	$\mu_{\max1}$ (mm/h)	$\mu_{\max2}$ (mm/h)
1	-1	-1	-1	-1	0,18	0,52
2	+1	-1	-1	+1	0,16	0,29
3	-1	+1	-1	+1	0,49	0,54
4	+1	+1	-1	-1	0,26	0,64
5	-1	-1	+1	+1	0,13	0,32
6	+1	-1	+1	-1	0,29	0,14
7	-1	+1	+1	-1	0,69	0,65
8	+1	+1	+1	+1	0,35	0,37
9	0	0	0	0	0,38	0,46
10	0	0	0	0	0,34	0,47
11	0	0	0	0	0,46	0,51

Na Tabela 4.16, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes e o valor de probabilidade para $\mu_{\max1}$.

Tabela 4.16. Efeitos estimados para os fatores independentes no valor de $\mu_{\max 1}$ para crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,340737	0,043557	7,82271	0,000230	0,234156	0,447319
(1) T_e	-0,147075	0,087374	-1,68328	0,143309	-0,360872	0,066722
(2)T	0,217575	0,087374	2,49015	0,047153	0,003778	0,431372
(3)R	0,049925	0,087374	0,57139	0,588483	-0,163872	0,263722
(4)HS	-0,115725	0,087374	-1,32448	0,233558	-0,329522	0,098072

*IC = Intervalo de Confiança

A 95% de significância, a temperatura de crescimento do fungo foi o único fator que influenciou a velocidade específica máxima de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi. Estes resultados foram confirmados pelo Teste de Pareto.

A Tabela 4.17 mostra os efeitos estimados para os fatores T_e e T e valores de probabilidade para $\mu_{\max 1}$ obtidos ao ignorar os menores fatores não significativos (R e HS).

Tabela 4.17. Efeitos estimados para T_e e T para a variável $\mu_{\max 1}$ no crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,323044	0,054894	5,88488	0,000368	0,196458	0,449629
(1) T_e	-0,001553	0,000829	-1,87214	0,098084	-0,003466	0,000360
(2)T	0,002022	0,000829	2,43792	0,040696	0,000109	0,003935

*IC = Intervalo de Confiança

A temperatura de crescimento do fungo tem um efeito positivo no parâmetro μ_{\max} , uma vez que a velocidade específica máxima de crescimento aumenta à medida que a temperatura aumenta perto da região de temperatura ótima.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para $\mu_{\max 2}$ na Tabela 4.15).

Na Tabela 4.18, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em $\mu_{\max 2}$.

Tabela 4.18. Efeitos estimados para os fatores independentes e valor de probabilidade para $\mu_{\max 2}$ para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,429505	0,021944	19,57262	0,000001	0,375809	0,483200
(1)T _e	-0,140141	0,044019	-3,18366	0,018988	-0,247852	-0,032431
(2)T	0,239509	0,044019	5,44103	0,001601	0,131798	0,347219
(3)R	-0,122641	0,044019	-2,78610	0,031740	-0,230352	-0,014931
(4)HS	-0,095691	0,044019	-2,17387	0,072673	-0,203402	0,012019

*IC = Intervalo de Confiança

A um nível de significância de 95%, a temperatura de formação dos esporos, a temperatura de crescimento e o *ratio* se mostraram significativos. O Teste de Pareto confirmou estes resultados.

A Tabela 4.19 mostra os efeitos estimados para os fatores T_e, T e R obtidos ao ignorar o fator não significativo (HS).

Tabela 4.19. Efeitos estimados para T_e, T e R e o valor de probabilidade, considerando $\mu_{\max 2}$ para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(7)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,468724	0,036684	12,77737	0,000004	0,381981	0,555468
(1)T _e	-0,001512	0,000528	-2,86062	0,024316	-0,002761	-0,000262
(2)T	0,002210	0,000528	4,18317	0,004121	0,000961	0,003460
(3)R	-0,001340	0,000528	-2,53593	0,038894	-0,002590	-0,000091

*IC = Intervalo de Confiança

A partir da análise da Tabela 4.19, conclui-se que a temperatura de formação dos esporos e o *ratio* exercem um efeito negativo na velocidade específica máxima de crescimento do fungo; ou seja, quanto maior a temperatura de formação dos esporos e quanto maior a quantidade de açúcar no suco (menor atividade de água), menor μ_{\max} . Com relação à temperatura de crescimento, quanto maior ela for, maior será este parâmetro (efeito positivo).

Segundo Gibson et al. (1994), que estudou a influência da atividade de água no crescimento de *Aspergillus flavus* em meio contendo glicose e frutose, a taxa de crescimento radial passou de

425 $\mu\text{m/h}$ a a_w de 0,99 para 70 $\mu\text{m/h}$ a a_w de 0,85. Valík & Piecková (2001) também reportaram que a taxa de crescimento diminui, ao diminuir a atividade de água, em estudo realizado para avaliar a influência da atividade de água no crescimento de *Neosartorya fischeri*, *Byssosclamyces fulva* e *Talaromyces avellaneus* em meio contendo sucrose. A taxa de crescimento radial para *N. fischeri* obtida pelos autores passou de 8,241 mm/dia a a_w de 0,90 para 2,789 mm/dia a a_w de 0,85.

De acordo com Vindelov & Arneborg (2002), ao aumentar a temperatura, há um aumento na velocidade de crescimento. Estes autores obtiveram um μ de 0,12 dias⁻¹ a 10°C e um μ de 0,44 dias⁻¹ a 20°C para crescimento do fungo *Wallemia sebi* em meio contendo açúcar branco. Samapundo et al. (2005) reportaram que a taxa de crescimento de fungos do gênero *Fusarium* em milho aumenta ao aumentar a temperatura de estocagem.

A segunda réplica mostrou mais fatores que influenciaram a velocidade específica máxima de crescimento de *N. fischeri*, confirmando a análise estatística que indicou diferenças significativas entre as réplicas.

3.3.3. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em A para crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi

A Tabela 4.20 mostra o planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A₁ (primeira réplica) e A₂ (segunda réplica).

Tabela 4.20. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A_1 e A_2 para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Ensaio	T_e	T	R	HS	A_1 (mm)	A_2 (mm)
1	-1	-1	-1	-1	17,5	33,2
2	+1	-1	-1	+1	14,2	22,8
3	-1	+1	-1	+1	35,7	38,5
4	+1	+1	-1	-1	9,3	22,9
5	-1	-1	+1	+1	10,8	21,4
6	+1	-1	+1	-1	19,2	17,5
7	-1	+1	+1	-1	29,8	32,8
8	+1	+1	+1	+1	33,3	30,0
9	0	0	0	0	22,4	27,4
10	0	0	0	0	32,7	30,9
11	0	0	0	0	27,3	41,2

Na Tabela 4.21, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes para A_1 .

Tabela 4.21. Efeitos estimados para os fatores independentes e valor de probabilidade para A_1 para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	23,07461	3,357736	6,87207	0,000468	14,8585	31,29069
(1) T_e	-8,11139	6,735467	-1,20428	0,273828	-24,5925	8,36971
(2)T	7,94861	6,735467	1,18011	0,282618	-8,5325	24,42971
(3)R	0,44861	6,735467	0,06660	0,949060	-16,0325	16,92971
(4)HS	0,93861	6,735467	0,13935	0,893730	-15,5425	17,41971

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Pode-se concluir que o diâmetro máximo não está sendo influenciado pelos fatores estudados. É possível que este

parâmetro seja influenciado por variáveis implícitas ao desenvolvimento das colônias, tais como: relação de tamanho entre uma colônia e outra ou a área entre colônias.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para A_2 na Tabela 4.20).

Na Tabela 4.22, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes e o valor de probabilidade na variável dependente A_2 .

Tabela 4.22. Efeitos estimados para os fatores independentes e valor de probabilidade para A_2 para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	27,94222	1,962110	14,24090	0,000007	23,1411	32,74333
(1) T_e	-9,28744	3,935905	-2,35967	0,056309	-18,9183	0,34337
(2)T	6,22256	3,935905	1,58097	0,164968	-3,4083	15,85337
(3)R	-5,04244	3,935905	-1,28114	0,247430	-14,6733	4,58837
(4)HS	0,48756	3,935905	0,12387	0,905461	-9,1433	10,11837

*IC = Intervalo de Confiança

Novamente nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância.

A Tabela 4.23 mostra o efeito estimado para o fator T_e obtido ao ignorar os menores fatores não significativos (T, R e HS).

Tabela 4.23. Efeito estimado de T_e e valor de probabilidade para A_2 para *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	32,14846	2,320576	13,85366	0,000000	26,89895	37,39797
(1) T_e	-0,08766	0,038100	-2,30076	0,046941	-0,17384	-0,00147

A temperatura de formação dos esporos exerce um efeito negativo no diâmetro máximo atingido pela colônia, uma vez que A diminuiu ao aumentar a mesma.

Nenhum resultado foi encontrado na literatura explicando a influência da temperatura de formação dos esporos no diâmetro máximo atingido pela colônia.

4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, *RATIO* E ESPAÇO LIVRE DA GARRAFA NO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* EM SUCO DE ABACAXI

A partir do planejamento experimental mostrado na Tabela 3.1, foram realizados 11 ensaios com quatro réplicas cada um. Entre as quatro réplicas foram selecionadas duas para a análise estatística do efeito dos fatores, pois, a partir da análise de variância ANOVA, detectou-se que houve diferença significativa entre as quatro réplicas de cada ensaio. O critério de escolha das réplicas foi: a curva na qual o fungo apresentou a menor fase de adaptação e a curva na qual o fungo apresentou a segunda menor fase de adaptação, representando a situação de maior risco para a indústria. As curvas de crescimento dos ensaios 1 ao 11 estão no Apêndice I.B.

A Tabela 4.24 mostra que há diferença significativa entre as réplicas ($p < 0,05$) para os parâmetros duração da fase de adaptação (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e diâmetro máximo atingido pela colônia (A).

Tabela 4.24. Análise estatística da diferença entre as réplicas para os parâmetros λ , μ_{\max} e A no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
λ	3926,3	3	1308,8	400,9	0,000021
μ_{\max}	0,389653	3	0,129884	731,03	0,000006
A	1010,923	3	336,974	2493,80	0,000001

Novamente, a diferença entre as réplicas pode ser explicada pelo fato de haver só um operador para enxaguar as garrafas após o tempo de contato com o sanitizante ácido peracético P3 Oxônia ativo 150 (Ecolab); resultando em um tempo maior de contato para as últimas garrafas, podendo levar a um residual maior de ácido nas mesmas. As outras condições de trabalho foram muito bem controladas.

A Tabela 4.25 mostra que não há diferença significativa ($p>0,05$) entre os modelos primários de Gompertz Modificado e Logístico no ajuste aos dados experimentais para os parâmetros λ , μ_{\max} e A .

Tabela 4.25. Análise estatística da diferença entre os modelos para os parâmetros λ , μ_{\max} e A no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
λ	11,0	1	11,0	0,0168	0,901113
μ_{\max}	0,000263	1	0,000263	0,00405	0,951321
A	0,370	1	0,370	0,00219	0,964157

4.1. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO E DO MODELO LOGÍSTICO

A Tabela 4.26 apresenta os parâmetros estatísticos para avaliar o ajuste dos dois modelos primários empregados. São mostrados neste item apenas os valores para a primeira réplica escolhida. Os valores para a segunda réplica se encontram no Apêndice II.B.

Tabela 4.26. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico no crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Ensaio	Modelo	r^2	MSE	Bias	Exatidão
1	Gompertz	0,9918	0,1241	1,0081	1,0212
	Logístico	0,9870	0,19786	1,0103	1,0269
2	Gompertz	0,9984	0,08562	1,0102	1,0206
	Logístico	0,9988	0,06509	1,0011	1,0132
3	Gompertz	0,9983	0,09556	1,0010	1,0104
	Logístico	0,9955	0,26418	1,0034	1,0178
4	Gompertz	0,9966	0,10906	1,0118	1,0224
	Logístico	0,9978	0,06714	1,0059	1,0123
5	Gompertz	0,9952	0,46136	1,0033	1,0213
	Logístico	0,9940	0,55166	1,0039	1,0246
6	Gompertz	0,9936	1,24824	1,0081	1,0298
	Logístico	0,9940	1,09893	1,0016	1,0357
7	Gompertz	0,9965	1,31806	1,0291	1,0553
	Logístico	0,9983	0,62081	1,0113	1,0257
8	Gompertz	0,9978	0,05741	1,0161	1,0367
	Logístico	0,9980	0,04843	1,0091	1,0193
9	Gompertz	0,9980	0,38812	1,0058	1,0132
	Logístico	0,9955	0,86549	1,0090	1,0185
10	Gompertz	0,9940	0,22351	1,0037	1,0488
	Logístico	0,9922	0,27860	0,9782	1,0616
11	Gompertz	0,9961	0,41924	1,0887	1,1086
	Logístico	0,9969	0,34795	1,0186	1,0373

*Os valores em negrito indicam o modelo de melhor ajuste.

Os dois modelos primários utilizados se ajustaram bem aos dados experimentais, com pequenas diferenças entre eles. Como se pode observar pela análise da Tabela 4.26, o Modelo Logístico se ajustou melhor (6 de 11 ensaios); uma vez que o valor de r^2 , o Fator Bias e o Fator de Exatidão foram mais próximos de 1 e o MSE mais próximo de zero. Assim como para a primeira

réplica, os dois modelos se ajustaram bem aos dados experimentais para a segunda réplica; entretanto, nesta o Modelo de Gompertz Modificado teve um ajuste ligeiramente superior ao Modelo Logístico na maioria dos ensaios realizados (6 de 11 ensaios) (ver Apêndice II.B).

Para melhor visualização da qualidade dos ajustes, estão apresentados nas Figuras 4.16(a) e 4.16(b), os valores do diâmetro observados experimentalmente contra os valores preditos pelos modelos primários. O Ensaio 2 foi escolhido aleatoriamente para a representação.

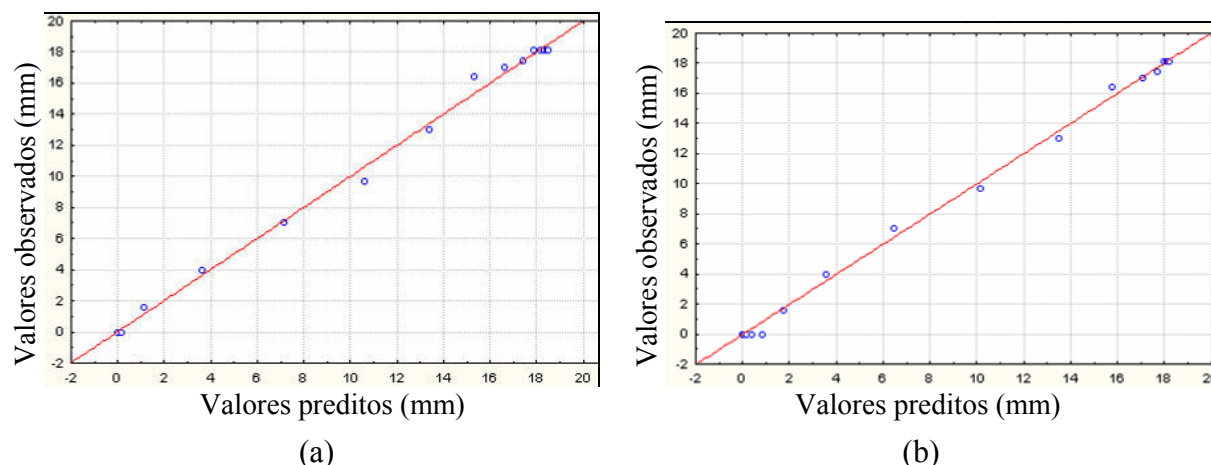


Figura 4.16. Valores de diâmetro observados versus valores de diâmetro preditos pelos modelos de Gompertz Modificado (a) e Logístico (b) para crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

As Figuras 4.16(a) e 4.16(b) mostram que os dados estão bem distribuídos na linha de equivalência para os dois modelos estudados.

4.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* EM SUCO DE ABACAXI

A Tabela 4.27 apresenta os parâmetros primários de crescimento (λ , μ_{\max} e A) e o tempo necessário para a colônia atingir 3 mm para cada ensaio.

Tabela 4.27. Parâmetros primários obtidos pelo modelo de melhor ajuste para o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Ensaio	Réplica	λ (h)	μ_{\max} (mm/h)	A (mm)	Tempo para atingir 3 mm (h)
1	Réplica 3	351,2	0,14	9,2	372,0
	Réplica 1	358,5	0,11	3,6	391,1
2	Réplica 2	303,5	0,31	18,2	312,3
	Réplica 3	307,1	0,50	30,6	303,7
3	Réplica 2	193,7	0,46	16,6	199,9
	Réplica 1	250,0	1,25	42,1	245,2
4	Réplica 1	633,0	0,20	17,5	642,2
	Réplica 2	726,7	0,55	18,7	731,7
5	Réplica 1	293,5	0,33	25,4	300,3
	Réplica 2	382,8	0,09	2,2	-
6	Réplica 1	312,2	0,39	39,3	299,8
	Réplica 3	312,5	0,49	48,5	294,6
7	Réplica 4	185,1	0,87	43,8	177,5
	Réplica 3	197,0	0,55	20,5	201,8
8	Réplica 2	232,0	0,15	11,9	250,7
	Réplica 1	237,0	0,19	19,5	244,5
9	Réplica 3	240,2	0,59	32,9	242,8
	Réplica 1	242,0	1,03	32,4	243,6
10	Réplica 3	211,6	0,14	15,7	231,4
	Réplica 4	222,0	0,43	25,6	227,2
11	Réplica 2	261,8	0,68	23,7	262,4
	Réplica 4	263,8	0,17	10,2	280,3

No Ensaio 4, réplica 2, houve a maior duração da fase de adaptação (726,7 horas), nas condições de maior temperatura de formação dos esporos, maior temperatura de crescimento, menor *ratio* e menor espaço livre. Por outro lado, a menor duração da fase de adaptação, ocorreu no Ensaio 7, réplica 4 (185,1 horas), nas condições de menor temperatura de formação dos esporos, maior temperatura de crescimento, maior *ratio* e o espaço livre mais baixo. Foi também

no Ensaio 7, réplica 4, que foi encontrado o menor tempo para a colônia atingir 3 mm, 177,5 horas; isso significa que em 7,4 dias o produto seria rejeitado pelo consumidor, nas condições estudadas.

Cabe salientar que a proximidade entre a temperatura de formação dos esporos e a temperatura de crescimento favorece o desenvolvimento do fungo. O espaço livre parece não ser importante, nas condições estudadas, mas o alto *ratio* parece favorecer o crescimento do fungo.

A Figura 4.17 apresenta uma comparação entre os ensaios de maior e menor duração da fase de adaptação.

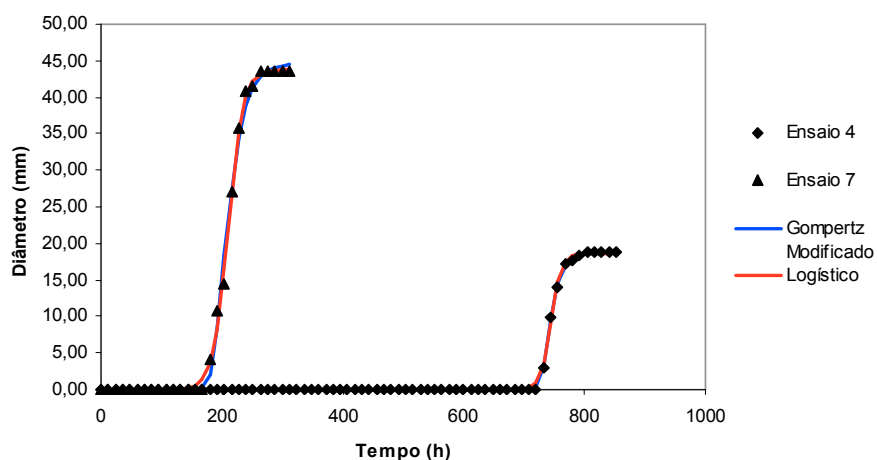


Figura 4.17. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram a maior (4) e a menor (7) duração da fase de adaptação para *B. nivea* em suco de abacaxi.

A velocidade específica máxima de crescimento apresentou o menor valor no Ensaio 5. Nesse Ensaio, a temperatura de formação dos esporos foi 25°C, a temperatura de crescimento 22°C, o *ratio* 38 e o espaço livre 28%. A maior velocidade específica máxima de crescimento foi observada no Ensaio 3, no qual as condições eram: temperatura de formação dos esporos 25°C, temperatura de crescimento 28°C, *ratio* 10 e espaço livre 28%.

O espaço livre, mais uma vez, não parece ser importante no desenvolvimento de *B. nivea*. No entanto, é evidente que a temperatura de crescimento e o *ratio* influenciaram o valor da velocidade específica máxima de crescimento.

A Figura 4.18 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor velocidade específica máxima de crescimento.

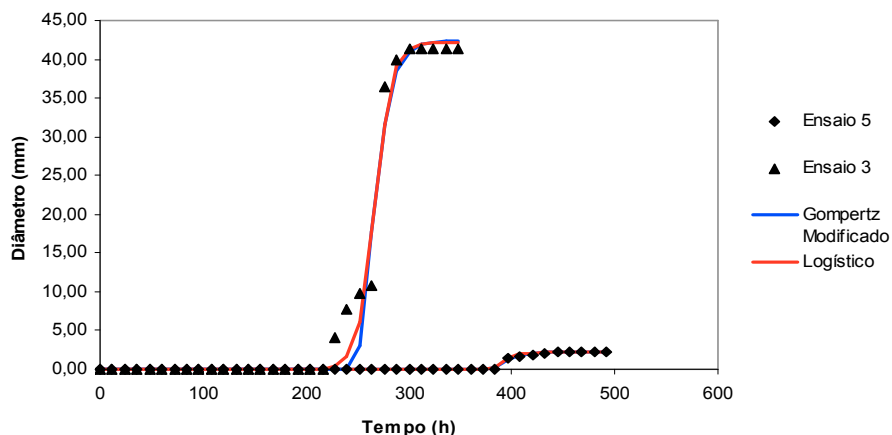


Figura 4.18. Comparação entre as curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram a maior (3) e a menor (5) velocidade específica máxima de crescimento para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Com relação ao diâmetro máximo atingido pela colônia, o maior valor obtido foi no Ensaio 6, nas condições de maior temperatura de formação dos esporos, menor temperatura de crescimento, alto *ratio* e espaço livre mais baixo. O menor diâmetro máximo alcançado pela colônia ocorreu no Ensaio 5, o mesmo que apresentou a menor velocidade específica máxima de crescimento.

Dessa vez, o *ratio* e a temperatura de crescimento parecem não ser importantes para o desenvolvimento do fungo; porém a temperatura de formação dos esporos e o espaço livre da garrafa parecem exercer alguma influência no diâmetro máximo atingido pela colônia.

A Figura 4.19 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor diâmetro máximo atingido pela colônia.

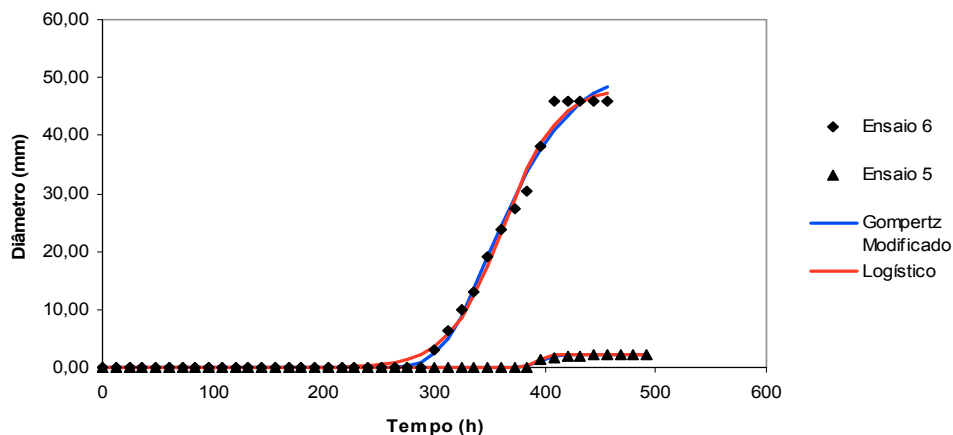


Figura 4.19. Comparação entre as curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o maior (6) e o menor (5) diâmetro máximo atingido pela colônia para *B. nivea* em suco de abacaxi.

O Ensaio 5 foi o que apresentou as piores condições para o crescimento de *B. nivea* (temperatura de formação dos esporos 25°C, temperatura de crescimento 22°C, *ratio* 38 e espaço livre 28%); uma vez que foi neste ensaio que se obteve a menor velocidade específica máxima de crescimento e o menor diâmetro máximo atingido pela colônia. Este fato é importante para o controle do fungo no suco.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO

Esta análise teve a finalidade de verificar quais foram os fatores, entre os quatro estudados, que afetaram significativamente os parâmetros de crescimento do *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi. Como o planejamento experimental foi apenas exploratório não foi possível estabelecer nenhum modelo secundário que descrevesse com exatidão o efeito dos fatores nos parâmetros de crescimento. A análise foi realizada no *software* Statistica 6.0, utilizou como dados de entrada os valores das variáveis independentes codificadas conforme o desenho experimental e como variável resposta os valores de λ , μ_{\max} e A .

Antes da análise estatística, foi feito um estudo preliminar para avaliar, dentro de um ensaio selecionado aleatoriamente, qual variável (λ , μ_{\max} ou A) entre as réplicas, tinha maior variabilidade. Este estudo foi feito desconsiderando-se os modelos. Calculou-se o desvio padrão, a média, o intervalo de confiança e o coeficiente de variação (Tabela 4.28).

Tabela 4.28. Média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação para as variáveis resposta λ , μ_{\max} e A das quatro repetições do Ensaio 7 (escolhido aleatoriamente) de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

	Média	Desvio Padrão	Intervalo de confiança (-95%)	Intervalo de confiança (+95%)	Coeficiente de Variação*
λ	210,9 h	23,7	191,1 h	230,7 h	11,2 %
μ_{\max}	0,54 mm/h	0,24	0,34 mm/h	0,74 mm/h	44,4%
A	24,9 mm	12,0	14,8 mm	34,9 mm	48,4%

*Coeficiente de Variação = (Desvio Padrão/Média)*100.

Pode-se concluir pela Tabela 4.28 que os valores de λ estão mais concentrados em torno da média (relação entre desvio padrão e média é igual a 11,2%); enquanto os valores de A possuem uma dispersão maior, onde essa relação é de 48,4%. As falhas nas medidas de diâmetro na fase estacionária, o uso da escala de conversão da lupa e, possivelmente, também à variabilidade inerente à colônia individual podem ter sido os motivos do alto valor do coeficiente de variação. A alta variabilidade do diâmetro máximo A também foi observada para *N. fischeri* no mesmo suco.

4.3.1. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em λ para crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi

Na Tabela 4.29, apresenta-se o planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 . Trata-se da primeira e segunda réplica de cada ensaio.

Tabela 4.29. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Ensaio	T_e	T	R	HS	λ_1 (h)	λ_2 (h)
1	-1	-1	-1	-1	351,2	358,5
2	+1	-1	-1	+1	303,5	307,1
3	-1	+1	-1	+1	193,7	250,0
4	+1	+1	-1	-1	633,0	726,7
5	-1	-1	+1	+1	293,5	382,8
6	+1	-1	+1	-1	312,2	312,5
7	-1	+1	+1	-1	185,1	197,0
8	+1	+1	+1	+1	232,0	237,0
9	0	0	0	0	240,2	242,0
10	0	0	0	0	211,6	222,0
11	0	0	0	0	261,8	263,8

Na Tabela 4.30, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em λ_1 . O coeficiente de correlação (r^2) não foi inserido, pois não estava sendo avaliada a qualidade do ajuste do modelo e sim, quais foram os efeitos significativos.

Tabela 4.30. Efeitos estimados e valor da probabilidade para os fatores independentes em λ_1 para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	295,2467	38,71397	7,62636	0,000265	200,517	389,9763
(1) T_e	149,1942	77,65848	1,92116	0,103101	-40,829	339,2176
(2)T	30,7342	77,65848	0,39576	0,705971	-159,289	220,7576
(3)R	-79,7958	77,65848	-1,02752	0,343803	-269,819	110,2276
(4)HS	-79,8458	77,65848	-1,02817	0,343524	-269,869	110,1776

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Foi testado também 90% de significância, mas continuou sem nenhum fator significativo.

Para confirmar este resultado, foi analisado o efeito dos fatores ambientais na segunda réplica do tempo de adaptação de cada ensaio (Desenho Experimental para λ_2 na Tabela 4.29).

Na Tabela 4.31, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em λ_2 .

Tabela 4.31. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes na variável λ_2 para crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	324,6844	51,5553	6,297787	0,000747	198,533	450,8357
(1)T _e	141,4231	103,4176	1,367495	0,220480	-111,631	394,4769
(2)T	55,1281	103,4176	0,533062	0,613147	-197,926	308,1819
(3)R	-85,6119	103,4176	-0,827827	0,439446	-338,666	167,4419
(4)HS	-61,8169	103,4176	-0,597741	0,571868	-314,871	191,2369

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Foi testado 90% de significância, mas continuou sem nenhum fator significativo. Estes resultados confirmam a análise da primeira réplica.

Pode-se concluir que, além das variáveis ambientais estudadas, podem existir outros fatores que são mais importantes para a duração da fase de adaptação, tais como pH e composição do suco; que não estavam dentro dos objetivos estudados nesta pesquisa. Outra hipótese seria que o planejamento experimental não foi suficientemente discriminativo para selecionar os fatores importantes para este fungo.

Cunha (2003), estudando o crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de abacaxi e suco de maracujá a 20°C e 30°C, observou que, ao aumentar a temperatura, a duração da fase lag passou de 66,46 horas para 36,40 horas no suco de abacaxi. O método utilizado para medida do crescimento foi o da diluição e plaqueamento e o modelo primário utilizado no ajuste das curvas foi o de Gompertz Modificado.

4.3.2. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em μ_{\max} para crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi

A Tabela 4.32 apresenta o planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max1}$ e $\mu_{\max2}$ correspondentes a primeira e a segunda réplica de cada ensaio.

Tabela 4.32. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max1}$ e $\mu_{\max2}$ para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Ensaio	T_e	T	R	HS	$\mu_{\max1}(\text{mm/h})$	$\mu_{\max2}(\text{mm/h})$
1	-1	-1	-1	-1	0,14	0,11
2	+1	-1	-1	+1	0,31	0,50
3	-1	+1	-1	+1	0,46	1,25
4	+1	+1	-1	-1	0,20	0,55
5	-1	-1	+1	+1	0,33	0,09
6	+1	-1	+1	-1	0,39	0,49
7	-1	+1	+1	-1	0,87	0,55
8	+1	+1	+1	+1	0,15	0,19
9	0	0	0	0	0,59	1,03
10	0	0	0	0	0,14	0,43
11	0	0	0	0	0,68	0,17

Na Tabela 4.33, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em $\mu_{\max1}$.

Tabela 4.33. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 1}$ para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,372484	0,085600	4,35143	0,004815	0,163027	0,581940
(1)T _e	-0,218465	0,171711	-1,27229	0,250352	-0,638626	0,201695
(2)T	0,096785	0,171711	0,56365	0,593417	-0,323376	0,516945
(3)R	0,123985	0,171711	0,72206	0,497423	-0,296176	0,544145
(4)HS	-0,121765	0,171711	-0,70913	0,504851	-0,541926	0,298395

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Foi testado também 90% de significância, mas continuou sem nenhum fator significativo.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho experimental para $\mu_{\max 2}$ na Tabela 4.32).

Na Tabela 4.34, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em $\mu_{\max 2}$.

Tabela 4.34. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 2}$ para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,483030	0,132868	3,63542	0,010894	0,157915	0,808145
(1)T _e	-0,097347	0,266526	-0,36525	0,727458	-0,749514	0,554819
(2)T	0,308203	0,266526	1,15637	0,291489	-0,343964	0,960369
(3)R	-0,306747	0,266526	-1,15091	0,293562	-0,958914	0,345419
(4)HS	0,054703	0,266526	0,20524	0,844169	-0,597464	0,706869

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Foi testado um nível de significância de 90%, mas continuou sem nenhum fator significativo.

Estes resultados confirmam a análise da primeira réplica. Pode-se concluir que, mais uma vez, além das variáveis estudadas, existem outros fatores que afetam o desenvolvimento do fungo, uma vez que nenhum dos fatores estudados foi significativo.

Estes resultados diferem dos relatados por Cunha (2003) que utilizou o método da diluição e plaqueamento para medida do crescimento de *Byssochlamys nivea* em suco de abacaxi e suco de maracujá a 20°C e 30°C. O autor observou que ao aumentar a temperatura, a velocidade específica máxima de crescimento passou de 0,06 h⁻¹ para 0,25 h⁻¹ no suco de abacaxi. O modelo utilizado para estimativa dos parâmetros foi o de Gompertz Modificado.

4.3.3. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em A para crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi

A Tabela 4.35 mostra o desenho experimental codificado e as variáveis resposta A₁ e A₂ (primeira e segunda réplica de cada ensaio).

Tabela 4.35. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A₁ e A₂ para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Ensaio	T _e	T	R	HS	A ₁ (mm)	A ₂ (mm)
1	-1	-1	-1	-1	9,2	3,6
2	+1	-1	-1	+1	18,2	30,6
3	-1	+1	-1	+1	16,6	42,1
4	+1	+1	-1	-1	17,5	18,7
5	-1	-1	+1	+1	25,4	2,2
6	+1	-1	+1	-1	39,3	48,5
7	-1	+1	+1	-1	43,8	20,5
8	+1	+1	+1	+1	11,9	19,5
9	0	0	0	0	32,9	32,4
10	0	0	0	0	15,7	25,6
11	0	0	0	0	23,7	10,2

Na Tabela 4.36, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em A₁.

Tabela 4.36. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_1 para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	23,0718	3,423054	6,74013	0,000520	14,6959	31,44776
(1) T_e	-2,7046	6,866492	-0,39389	0,707279	-19,5063	14,09705
(2)T	-1,3246	6,866492	-0,19291	0,853390	-18,1263	15,47705
(3)R	14,0454	6,866492	2,04549	0,086782	-2,7563	30,84705
(4)HS	-10,1246	6,866492	-1,47450	0,190789	-26,9263	6,67705

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Foi testado 90% de significância para avaliar se algum fator se tornava significativo. A Tabela 4.37 apresenta os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes a 90% de significância.

Tabela 4.37. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_1 para crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-90%)	IC (+90%)
Intercepto	23,0718	3,423054	6,74013	0,000520	16,4202	29,72346
(1) T_e	-2,7046	6,866492	-0,39389	0,707279	-16,0475	10,63818
(2)T	-1,3246	6,866492	-0,19291	0,853390	-14,6675	12,01818
(3)R	14,0454	6,866492	2,04549	0,086782	0,7025	27,38818
(4)HS	-10,1246	6,866492	-1,47450	0,190789	-23,4675	3,21818

*IC = Intervalo de Confiança

A 90% de significância, o *ratio* se tornou um fator significativo ($p < 0,10$). Este resultado foi confirmado pelo Teste de Pareto.

A Tabela 4.38 apresenta os efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores R e HS, quando foram retiradas as variáveis de menor importância (T_e e T).

Tabela 4.38. Efeitos estimados para R e HS em A₁ para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p	IC* (-90%)	IC (+90%)
Intercepto	22,18268	3,827794	5,79516	0,000407	15,06472	29,30065
(3)R	0,13091	0,057839	2,26330	0,053447	0,02335	0,23846
(4)HS	-0,10605	0,057839	-1,83363	0,104056	-0,21361	0,00150

*IC = Intervalo de Confiança

Pode-se concluir que, para um nível de significância de 95%, nenhum dos fatores estudados foi significativo, porém ao reduzir o nível de significância para 90%, o *ratio* passou a ser significativo para o diâmetro máximo atingido pela colônia. Possivelmente, isso se deve ao fato de que quando o *ratio* é maior, há uma maior densidade no meio (mais açúcares), facilitando a sustentação da colônia superficial do fungo e o seu desenvolvimento (efeito positivo).

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho experimental para A₂ na Tabela 4.35).

Na Tabela 4.39, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em A₂.

Tabela 4.39. Efeitos estimados para os fatores independentes em A₂ para *B. nivea* em suco de abacaxi.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	24,18056	5,85897	4,127100	0,006167	9,8442	38,51694
(1)T _e	10,30224	11,75283	0,876575	0,414431	-18,4559	39,06038
(2)T	2,07224	11,75283	0,176318	0,865844	-26,6859	30,83038
(3)R	-3,01276	11,75283	-0,256343	0,806249	-31,7709	25,74538
(4)HS	-1,12276	11,75283	-0,095531	0,927004	-29,8809	27,63538

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Estes resultados confirmam a análise da primeira réplica, porém ao analisar um nível de significância mais baixo (90%), todos os fatores continuaram sem importância, nas faixas estudadas; diferente da réplica anterior. Este fato

mantém as observações de que há diferença significativa entre as réplicas e que outros fatores podem ser mais importantes para o desenvolvimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Cunha (2003), utilizando o método da diluição e plaqueamento para medida do crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi e suco de maracujá a 20°C e 30°C e utilizando o Modelo de Gompertz Modificado para estimativa dos parâmetros, observou que, ao aumentar a temperatura, o valor do parâmetro A passou de 3,67 para 3,90 no suco de abacaxi. No entanto, este autor não indicou se a diferença foi significativa ou não.

5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, *RATIO* E ESPAÇO LIVRE DA GARRAFA NO CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE MAMÃO

A partir do planejamento experimental (Tabela 3.1), foram realizados 11 ensaios com quatro réplicas cada um. Entre as quatro réplicas foram selecionadas duas para a análise estatística do efeito dos fatores ambientais, pois, a partir da ANOVA, detectou-se que houve diferença significativa entre as réplicas de cada ensaio. O critério de escolha das réplicas foi: a curva na qual o fungo apresentou a menor fase de adaptação e a curva na qual o fungo apresentou a segunda menor fase de adaptação. As curvas de crescimento dos ensaios 1 ao 11 estão no Apêndice I.C.

A Tabela 4.40 mostra que há diferença significativa entre as réplicas ($p < 0,05$) para os parâmetros duração da fase de adaptação (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e diâmetro máximo atingido pela colônia (A) para crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

Tabela 4.40. Análise estatística da diferença entre as réplicas para os parâmetros λ , μ_{\max} e A para *N. fischeri* em suco de mamão.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
λ	1599,12	2	799,56	134,14	0,001163
μ_{\max}	0,117442	2	0,058721	636,60	0,000114
A	1114,771	2	557,385	474,775	0,000177

De forma similar aos resultados com suco de abacaxi, a Tabela 4.41 mostra que não há diferença significativa ($p>0,05$), entre os modelos primários de Gompertz Modificado e Logístico no ajuste aos dados experimentais para os parâmetros λ , μ_{\max} e A .

Tabela 4.41. Análise estatística da diferença entre os modelos para os parâmetros λ , μ_{\max} e A de *N. fischeri* em suco de mamão.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
λ	17,37	1	17,37	0,0434	0,845072
μ_{\max}	0,000237	1	0,000237	0,00807	0,932758
A	2,884	1	2,884	0,01034	0,923887

Ambos os modelos servem para representar os parâmetros biológicos λ , μ_{\max} e A .

5.1. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO E DO MODELO LOGÍSTICO

A Tabela 4.42 apresenta os parâmetros estatísticos para validar o ajuste dos dois modelos primários empregados para avaliar o crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão. Serão mostrados neste tópico apenas os valores para a primeira réplica escolhida. Os valores para a segunda réplica se encontram no Apêndice II.C.

Tabela 4.42. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico no crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

Ensaio	Modelo	r^2	MSE	Bias	Exatidão
1	Gompertz	0,9970	0,22192	1,0046	1,0122
	Logístico	0,9945	0,39761	1,0071	1,0152
2	Gompertz	0,9977	0,28341	1,0064	1,0131
	Logístico	0,9973	0,29529	0,9988	1,0122
3	Gompertz	0,9941	0,27769	1,0043	1,0285
	Logístico	0,9893	0,51143	1,0072	1,0400
4	Gompertz	0,9889	0,74422	1,0157	1,0400
	Logístico	0,9826	1,16258	1,0228	1,0455
5	Gompertz	0,9985	0,10832	1,0021	1,0111
	Logístico	0,9971	0,20906	0,9942	1,0146
6	Gompertz	0,9996	0,03877	1,0011	1,0035
	Logístico	0,9984	0,16953	1,0011	1,0046
7	Gompertz	0,9916	0,78106	1,0114	1,0376
	Logístico	0,9909	0,80798	1,0060	1,0302
8	Gompertz	0,9978	0,29215	1,0053	1,0205
	Logístico	0,9972	0,36439	1,0058	1,0170
9	Gompertz	0,9906	2,44184	0,9994	1,0688
	Logístico	0,9883	2,91414	1,0027	1,0798
10	Gompertz	0,9877	1,02046	1,0171	1,0507
	Logístico	0,9817	1,49013	1,0233	1,0574
11	Gompertz	0,9926	1,12031	1,0468	1,0858
	Logístico	0,9948	0,74717	1,0257	1,0452

*Os valores em negrito indicam o modelo de melhor ajuste.

Como se pode observar pela análise da Tabela 4.42, os dois modelos se ajustaram bem aos dados experimentais, entretanto, o Modelo de Gompertz Modificado apresentou uma performance ligeiramente superior (10 de 11 ensaios), visto que o r^2 , o Fator Bias e o Fator de Exatidão foram mais próximos de 1 e o MSE mais próximo de zero. Os dois modelos primários empregados se

ajustaram bem aos dados experimentais também para a segunda réplica escolhida, mas nenhum teve uma performance diferenciada; pois nesta cada modelo mostrou melhor ajuste em cinco dos 10 ensaios realizados (o Ensaio 2 não apresentou crescimento nas outras réplicas).

Para melhor visualização da qualidade dos ajustes, estão apresentados nas Figuras 4.20(a) e 4.20(b), os valores observados experimentalmente contra os valores preditos pelos modelos de Gompertz Modificado e Logístico para o diâmetro da colônia, respectivamente. Os resultados do Ensaio 6 foram escolhidos aleatoriamente para a representação.

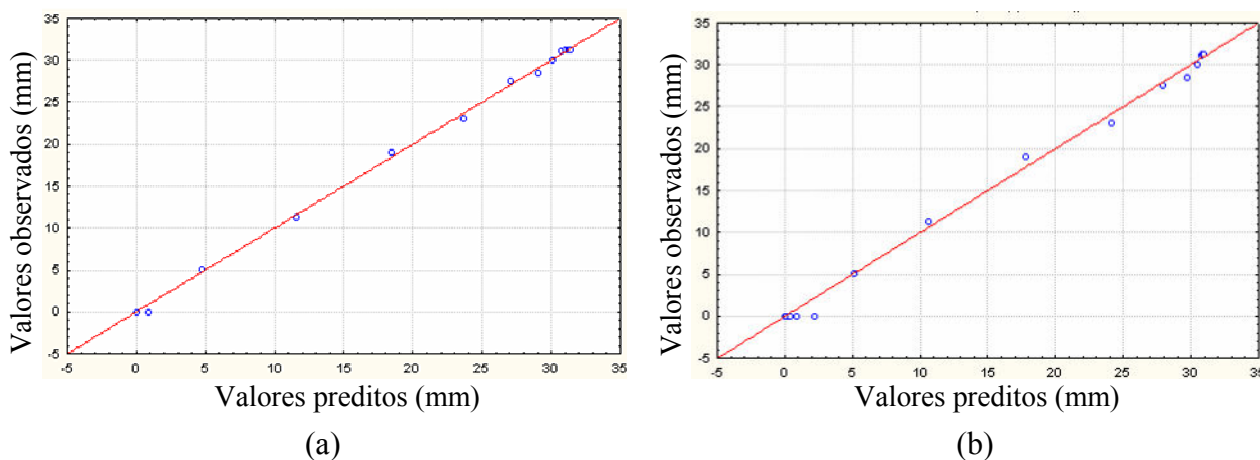


Figura 4.20. Valores de diâmetro observados versus valores de diâmetro preditos pelos modelos de Gompertz Modificado (a) e Logístico (b) para crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

As Figuras 4.20(a) e 4.20(b) mostram que os dados estão bem distribuídos na linha de equivalência, portanto, ambos os modelos se ajustam bem aos dados experimentais.

5.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO DE *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE MAMÃO

A Tabela 4.43 apresenta os parâmetros primários de crescimento (λ , μ_{\max} e A) e o tempo necessário para a colônia atingir 3 mm.

Tabela 4.43. Parâmetros primários obtidos pelo modelo de melhor ajuste para *N. fischeri* em suco de mamão.

Ensaio	Réplica	λ (h)	μ_{\max} (mm/h)	A (mm)	Tempo para atingir 3 mm (h)
1	Réplica 3	407,5	0,36	24,0	414,0
	Réplica 2	434,4	0,54	24,2	435,0
2	Réplica 3	591,6	0,42	37,3	594,1
	Réplica -	-	-	-	-
3	Réplica 2	107,7	0,38	14,0	115,3
	Réplica 1	110,1	0,33	14,7	118,8
4	Réplica 1	125,7	0,23	19,4	137,3
	Réplica 2	128,1	0,29	12,7	138,2
5	Réplica 1	674,0	0,47	29,7	678,0
	Réplica 2	679,2	0,51	36,9	671,6
6	Réplica 3	701,2	0,61	31,4	704,0
	Réplica 2	708,4	0,48	32,6	711,7
7	Réplica 3	166,0	0,32	25,0	173,1
	Réplica 2	168,7	0,57	45,4	168,7
8	Réplica 2	162,2	0,55	26,5	166,2
	Réplica 3	165,7	0,73	25,7	165,5
9	Réplica 1	101,6	0,35	40,5	103,4
	Réplica 2	123,6	0,40	21,0	126,3
10	Réplica 2	93,7	0,18	23,6	107,3
	Réplica 3	105,1	0,24	13,6	115,6
11	Réplica 4	114,9	0,37	27,1	113,4
	Réplica 3	121,3	0,39	28,0	126,6

- Dados não disponíveis.

No Ensaio 6, réplica 2, houve o maior tempo de adaptação (708,4 horas), nas condições: temperatura de formação dos esporos 35°C, temperatura de crescimento 22°C, *ratio* 66 e espaço livre 8%. Por outro lado, o menor tempo de adaptação ocorreu no Ensaio 10, réplica 2, na condição central do planejamento experimental (93,7 horas), pois certamente neste ensaio as condições são

mais favoráveis para o crescimento do fungo. O menor tempo para a colônia atingir 3 mm, 103,4 horas, foi obtido no Ensaio 9, réplica 1; isto significa que em 4,3 dias o produto seria rejeitado pelo consumidor se estocado nestas condições (temperatura de formação dos esporos 30°C, temperatura de crescimento do fungo 25°C, *ratio* 46 e espaço livre 18%).

Este resultado sugere que nas condições mais estressantes para o fungo em termos de temperatura de crescimento (menor), *ratio* (maior) e temperatura de formação dos esporos (maior), ocorreu uma maior duração da fase de adaptação e, conseqüentemente, a colônia do fungo demorou mais para aparecer.

A Figura 4.21 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor tempo de adaptação.

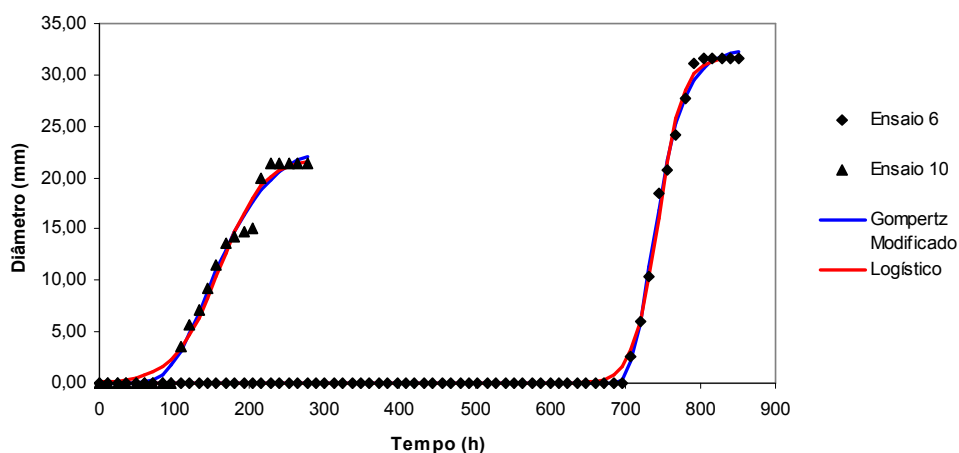


Figura 4.21. Comparação das curvas de crescimento de *N.fischeri* em suco de mamão nos Ensaios 6 e 10, que apresentaram o maior e o menor tempo de adaptação, respectivamente.

Com relação à velocidade específica máxima de crescimento, o Ensaio 10 apresentou o menor valor; o mesmo ensaio que obteve o menor tempo de adaptação. A maior velocidade específica máxima de crescimento foi observada no Ensaio 8, no qual a temperatura de formação dos esporos foi 35°C, a temperatura de crescimento 28°C, *ratio* 66 e espaço livre 28%; ou seja todos os efeitos elevados influenciaram positivamente no desenvolvimento do fungo.

A Figura 4.22 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor velocidade específica máxima de crescimento.

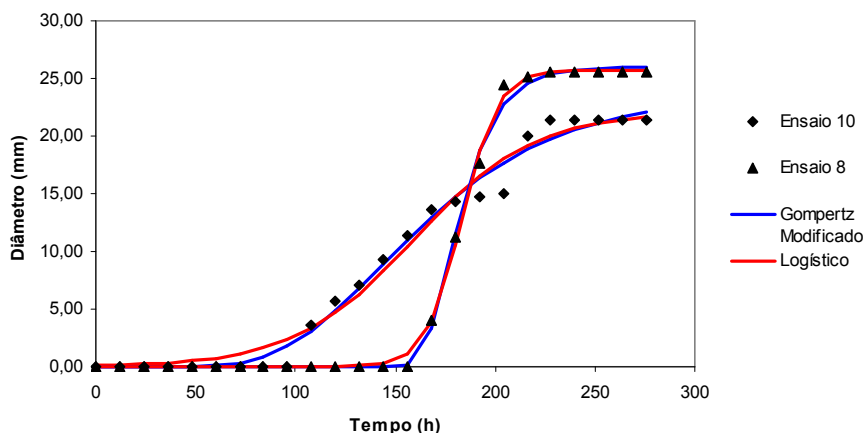


Figura 4.22. Comparação entre as curvas de crescimento nos ensaios que apresentaram a maior (8) e a menor (10) velocidade específica máxima de crescimento de *N.fischeri* em suco de mamão.

O maior diâmetro máximo atingido pela colônia ocorreu no Ensaio 7, no qual a temperatura de formação dos esporos foi 25°C, a temperatura de crescimento do fungo 28°C, *ratio* 66 e espaço livre 8%. O Ensaio 4, apresentou o menor diâmetro máximo alcançado pela colônia, no qual as condições eram: temperatura de formação dos esporos 35°C, temperatura de crescimento 28°C, *ratio* 26 e espaço livre 8%.

A temperatura de crescimento e o espaço livre parecem não influenciar o parâmetro A, enquanto a temperatura de formação dos esporos e o *ratio* parecem exercer alguma influência; uma vez que o ensaio no qual os esporos foram produzidos a uma temperatura mais amena e a concentração de açúcares foi maior, apresentou o maior valor de A.

A Figura 4.23 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor diâmetro máximo atingido pela colônia.

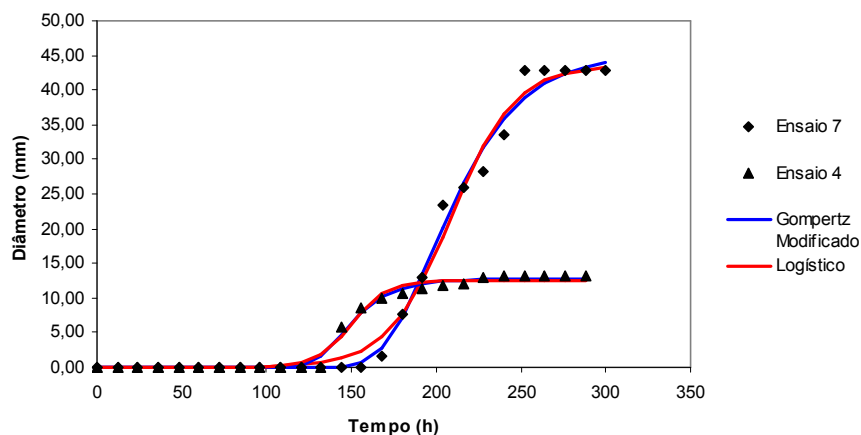


Figura 4.23. Comparação entre as curvas de crescimento nos ensaios que apresentaram o maior (7) e o menor (4) diâmetro máximo atingido pela colônia de *N.fischeri* em suco de mamão.

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO

Esta análise teve a finalidade de esclarecer quais foram os fatores, entre os quatro estudados, que afetaram significativamente os parâmetros de crescimento de *Neosartorya fischeri* em suco de mamão. Como o planejamento experimental foi apenas exploratório não foi possível estabelecer nenhum modelo secundário que descrevesse com precisão o efeito dos fatores ambientais nos parâmetros biológicos de crescimento. A análise foi realizada no *software* Statistica 6.0, utilizou o desenho experimental e como variável resposta os valores de λ , μ_{\max} e A .

Antes da análise estatística, foi feito um estudo para avaliar, dentro de cada ensaio, qual variável (λ , μ_{\max} ou A) entre as réplicas, tinha maior variabilidade. Este estudo foi feito desconsiderando-se os modelos. Calculou-se o desvio padrão, a média, o intervalo de confiança e o coeficiente de variação de um dos ensaios escolhido aleatoriamente (Tabela 4.44).

Tabela 4.44. Média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação para as variáveis resposta λ , μ_{\max} e A das quatro repetições do Ensaio 11 (escolhido aleatoriamente) para crescimento de *N.fischeri* em suco de mamão.

	Média	Desvio Padrão	Intervalo de confiança (-95%)	Intervalo de confiança (+95%)	Coeficiente de Variação*
λ	129,0 h	18,0	110,1 h	147,8 h	13,9%
μ_{\max}	0,48 mm/h	0,15	0,31 mm/h	0,64 mm/h	32,3%
A	37,3 mm	15,0	21,6 mm	53,0 mm	40,1%

*Coeficiente de Variação = (Desvio Padrão/Média)*100.

Pode-se concluir pela análise da Tabela 4.44 que os valores de λ estão mais concentrados em torno da média (coeficiente de variação é igual a 13,9%). Por outro lado, os valores de A, possuem uma dispersão maior, onde essa relação é de 40,1%. Uma possível explicação são as falhas nas medidas de diâmetro no início da fase estacionária e o uso da escala de conversão da lupa.

5.3.1. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em λ para crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão

Na Tabela 4.45, apresenta-se o planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 . Trata-se da primeira e segunda réplica de cada ensaio.

Tabela 4.45. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 de *N. fischeri* em suco de mamão.

Ensaio	T_e	T	R	HS	$\lambda_1(h)$	$\lambda_2(h)$
1	-1	-1	-1	-1	407,5	434,4
2	+1	-1	-1	+1	591,6	-
3	-1	+1	-1	+1	107,7	110,1
4	+1	+1	-1	-1	125,7	128,1
5	-1	-1	+1	+1	674,0	679,2
6	+1	-1	+1	-1	701,2	708,4
7	-1	+1	+1	-1	166,0	168,7
8	+1	+1	+1	+1	162,3	165,7
9	0	0	0	0	101,6	123,6
10	0	0	0	0	93,7	105,1
11	0	0	0	0	114,9	121,3

Na Tabela 4.46, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores em λ_1 . O coeficiente de correlação (r^2) não foi inserido, pois não estava sendo avaliada a qualidade do ajuste do modelo e sim, quais foram os efeitos significativos.

Tabela 4.46. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em λ_1 para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	315,894	56,3489	5,60603	0,001373	178,013	453,7747
(1) T_e	156,599	113,0334	1,38542	0,215229	-119,984	433,1814
(2)T	-352,991	113,0334	-3,12289	0,020509	-629,574	-76,4086
(3)R	217,919	113,0334	1,92791	0,102139	-58,664	494,5014
(4)HS	133,999	113,0334	1,18548	0,280646	-142,584	410,5814

*IC = Intervalo de Confiança

A temperatura de crescimento do fungo foi o único fator significativo a 95% de significância. Estes resultados foram verificados pelo Teste de Pareto, que indica o parâmetro T como significativo (Figura 4.24).

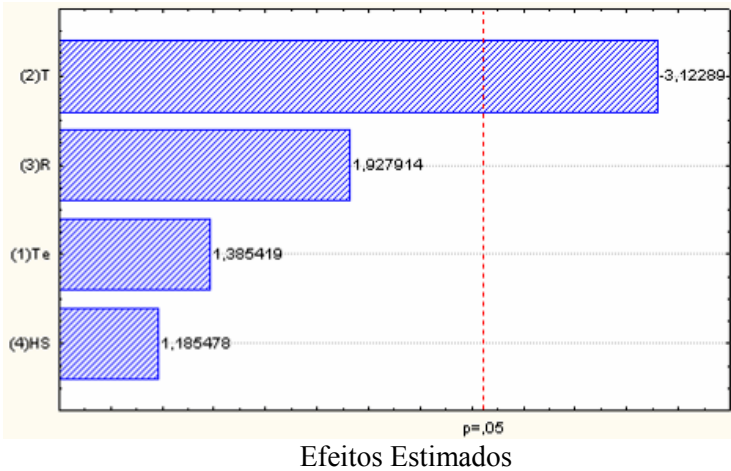


Figura 4.24. Gráfico de Pareto dos efeitos para a variável λ_1 de *N. fischeri* em suco de mamão.

A Tabela 4.47 mostra os efeitos estimados para os fatores T e R obtidos ao ignorar os menores fatores não significativos (T_e e HS).

Tabela 4.47. Efeitos estimados e valores de probabilidade para T e R em λ_1 para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	307,6230	79,46139	3,87135	0,004732	124,3847	490,8613
(2)T	-2,9707	1,20067	-2,47423	0,038456	-5,7395	-0,2020
(3)R	2,6264	1,20067	2,18745	0,060160	-0,1423	5,3952

*IC = Intervalo de Confiança

O sinal negativo indica que ao aumentar a temperatura de crescimento, diminui o tempo de adaptação; isto é verdadeiro apenas até o fungo atingir a temperatura ótima.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para λ_2 na Tabela 4.45).

Na Tabela 4.48, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores em λ_2 .

Tabela 4.48. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em λ_2 para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	321,579	56,3901	5,70275	0,001257	183,597	459,5605
(1)T _e	151,730	113,1160	1,34136	0,228343	-125,055	428,5148
(2)T	-358,905	113,1160	-3,17289	0,019248	-635,690	-82,1202
(3)R	215,805	113,1160	1,90782	0,105025	-60,980	492,5898
(4)HS	128,110	113,1160	1,13255	0,300623	-148,675	404,8948

*IC = Intervalo de Confiança

Novamente a temperatura de crescimento foi o único fator significativo a 95% de significância. Estes resultados foram confirmados pelo Teste de Pareto.

A Tabela 4.49 mostra os efeitos estimados para os fatores T e R obtidos ao ignorar os menores fatores não significativos (T_e e HS).

Tabela 4.49. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores T e R em λ_2 para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	320,0003	78,36495	4,08346	0,003517	139,2904	500,7102
(2)T	-3,0469	1,18411	-2,57313	0,032967	-5,7774	-0,3163
(3)R	2,5876	1,18411	2,18523	0,060368	-0,1430	5,3181

*IC = Intervalo de Confiança

Estes resultados confirmam a análise da primeira réplica, indicando que apenas a temperatura de crescimento do fungo foi o fator relevante para determinar a duração da fase de adaptação. Pode-se dizer ainda que ela teve um efeito negativo sobre o valor de λ , o que significa que ao aumentar a temperatura, ocorre uma diminuição na fase de adaptação.

Vindelov & Arneborg (2002), estudando os parâmetros de crescimento do fungo *Wallemia sebi* em meio contendo açúcar cristalino extra branco, observaram que a duração da fase lag passou de 5 dias a 10°C para 4 dias a 20°C. O modelo utilizado para descrever a curva de crescimento foi o de Gompertz Modificado.

5.3.2. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em μ_{\max} para crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão

A Tabela 4.50 mostra o desenho experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max1}$ e $\mu_{\max2}$ (primeira e segunda réplica).

Tabela 4.50. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max1}$ e $\mu_{\max2}$ para *N. fischeri* em suco de mamão.

Ensaio	T_e	T	R	HS	$\mu_{\max1}$ (mm/h)	$\mu_{\max2}$ (mm/h)
1	-1	-1	-1	-1	0,36	0,54
2	+1	-1	-1	+1	0,42	-
3	-1	+1	-1	+1	0,38	0,33
4	+1	+1	-1	-1	0,23	0,29
5	-1	-1	+1	+1	0,47	0,51
6	+1	-1	+1	-1	0,61	0,48
7	-1	+1	+1	-1	0,32	0,57
8	+1	+1	+1	+1	0,55	0,73
9	0	0	0	0	0,35	0,40
10	0	0	0	0	0,18	0,24
11	0	0	0	0	0,37	0,39

Na Tabela 4.51, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em $\mu_{\max1}$.

Tabela 4.51. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 1}$ para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,414407	0,030961	13,38492	0,000011	0,338649	0,490165
(1)T _e	0,077540	0,062106	1,24851	0,258352	-0,074428	0,229507
(2)T	-0,089260	0,062106	-1,43723	0,200685	-0,241228	0,062707
(3)R	0,143040	0,062106	2,30316	0,060836	-0,008928	0,295007
(4)HS	0,081640	0,062106	1,31453	0,236680	-0,070328	0,233607

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância.

A Tabela 4.52 mostra o efeito estimado para o fator R obtido ao ignorar os menores fatores não significativos (T, HS e T_e).

Tabela 4.52. Efeito estimado e valor de probabilidade para R em $\mu_{\max 1}$ para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,329765	0,038897	8,477815	0,000014	0,241773	0,417757
(3)R	0,001545	0,000639	2,418831	0,038685	0,000100	0,002989

*IC = Intervalo de Confiança

Pode-se concluir que o *ratio* exerce uma influência positiva na velocidade específica máxima de crescimento, ou seja, ela aumenta a medida que aumenta a quantidade de açúcar no meio.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para $\mu_{\max 2}$ na Tabela 4.50).

Na Tabela 4.53, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em $\mu_{\max 2}$ para crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

Tabela 4.53. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 2}$ para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,479058	0,040519	11,82295	0,000022	0,379911	0,578205
(1)T _e	0,005060	0,081280	0,06226	0,952381	-0,193825	0,203945
(2)T	0,006510	0,081280	0,08010	0,938766	-0,192375	0,205395
(3)R	0,189510	0,081280	2,33157	0,058515	-0,009375	0,388395
(4)HS	0,042860	0,081280	0,52732	0,616895	-0,156025	0,241745

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância.

Ao ignorar os efeitos de menor importância (HS, T e T_e), o *ratio* se tornou significativo (Tabela 4.54). Estes resultados confirmam a análise da primeira réplica.

Tabela 4.54. Efeito estimado para o fator R em $\mu_{\max 2}$ de *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,374854	0,038807	9,659417	0,000005	0,287066	0,462641
(3)R	0,001969	0,000637	3,090020	0,012929	0,000527	0,003410

*IC = Intervalo de Confiança

Pode-se concluir que o *ratio* exerce uma influência positiva na velocidade específica máxima de crescimento, ou seja, ela aumenta a medida que o *ratio* aumenta; nas condições estudadas. Segundo Gibson et al. (1994), a taxa de crescimento radial diminuiu com a diminuição da a_w , em estudo realizado sobre a influência da atividade de água no crescimento de *Aspergillus flavus* em meio contendo glicose e frutose. Valík & Piecková (2001) também reportaram que a taxa de crescimento para *N. fischeri* em meio contendo sucrose diminui, ao diminuir a atividade de água; essa passou de 8,241 mm/dia a a_w de 0,90 para 2,789 mm/dia a a_w de 0,85.

5.3.3. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em A para crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão

A Tabela 4.55 apresenta o planejamento experimental codificado e os valores das variáveis resposta A_1 e A_2 (primeira e segunda réplica).

Tabela 4.55. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A_1 e A_2 para *N. fischeri* em suco de mamão.

Ensaio	T_e	T	R	HS	A_1 (mm)	A_2 (mm)
1	-1	-1	-1	-1	24,0	24,2
2	+1	-1	-1	+1	37,3	-
3	-1	+1	-1	+1	14,0	14,7
4	+1	+1	-1	-1	19,4	12,7
5	-1	-1	+1	+1	29,7	36,9
6	+1	-1	+1	-1	31,4	32,6
7	-1	+1	+1	-1	25,0	45,4
8	+1	+1	+1	+1	26,5	25,7
9	0	0	0	0	40,5	21,0
10	0	0	0	0	23,6	13,6
11	0	0	0	0	27,1	28,0

Na Tabela 4.56, encontram-se os efeitos estimados e valores de probabilidade para cada um dos fatores independentes em A_1 .

Tabela 4.56. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_1 para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	26,6718	2,221331	12,00712	0,000020	21,2364	32,10719
(1) T_e	3,9812	4,455890	0,89348	0,406009	-6,9219	14,88442
(2)T	-10,8788	4,455890	-2,44143	0,050374	-21,7819	0,02442
(3)R	2,9962	4,455890	0,67242	0,526347	-7,9069	13,89942
(4)HS	0,4262	4,455890	0,09566	0,926906	-10,4769	11,32942

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância.

Ao ignorar os efeitos não significativos de menor importância (T_e , R e HS), a temperatura de crescimento se tornou significativa (Tabela 4.57).

Tabela 4.57. Efeito estimado e valor de probabilidade para T em A_1 para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	30,46651	2,330403	13,07349	0,000000	25,19477	35,73824
(2)T	-0,09158	0,038261	-2,39354	0,040323	-0,17813	-0,00503

*IC = Intervalo de Confiança

Pode-se concluir que a temperatura de crescimento do fungo exerce um efeito negativo no diâmetro máximo atingido pela colônia; ou seja, a medida que a temperatura aumenta, o diâmetro diminui. Uma explicação para este fato é que ao aumentar a temperatura de crescimento, o número de colônias aumenta e estas têm que disputar o mesmo espaço superficial para crescer.

Vindelov & Arneborg (2002), ao avaliarem a influência da temperatura no crescimento de *Wallemia sebi* em meio contendo açúcar extra branco, reportaram que o valor de A aumentou com o aumento da temperatura de estocagem do fungo, passando de 4,9 a 10°C para 5,3 a 20°C.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para A_2 na Tabela 4.55).

Na Tabela 4.58, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em A₂ para *N. fischeri* em suco de mamão.

Tabela 4.58. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A₂ para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	27,73282	3,250817	8,531030	0,000142	19,7784	35,68728
(1)T _e	-1,39733	6,520992	-0,214283	0,837424	-17,3536	14,55896
(2)T	-6,29233	6,520992	-0,964935	0,371842	-22,2486	9,66396
(3)R	14,76767	6,520992	2,264635	0,064139	-1,1886	30,72396
(4)HS	1,76267	6,520992	0,270306	0,795982	-14,1936	17,71896

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância.

Ao ignorar os efeitos de menor importância (T, HS e T_e), o *ratio* se tornou significativo (Tabela 4.59).

Tabela 4.59. Efeito estimado e valor de probabilidade para o fator R em A₂ para *N. fischeri* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	21,72500	3,288623	6,606110	0,000099	14,28562	29,16438
(3)R	0,13271	0,053993	2,457955	0,036280	0,01057	0,25485

*IC = Intervalo de Confiança

O *ratio* exerce uma influência positiva no diâmetro máximo atingido pela colônia, ou seja, A aumenta a medida que o *ratio* aumenta. Uma explicação para este fato é que, quando o *ratio* é maior, há uma maior densidade no meio (mais açúcares), facilitando a sustentação da colônia e o seu desenvolvimento.

Estes resultados são diferentes dos obtidos pela análise da primeira réplica, na qual a temperatura de crescimento foi significativa; confirmando a diferença entre as réplicas.

6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE FORMAÇÃO DOS ESPOROS, TEMPERATURA DE CRESCIMENTO, *RATIO* E ESPAÇO LIVRE DA GARRAFA NO CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* EM SUCO DE MAMÃO

A partir do planejamento experimental mostrado na Tabela 3.1, foram realizados 11 ensaios com quatro réplicas cada um. Entre as quatro réplicas foram selecionadas duas para a análise estatística do efeito dos fatores ambientais, pois, a partir da análise de variância ANOVA, detectou-se que houve diferença significativa entre as quatro réplicas para cada ensaio. O critério de escolha das réplicas foi: a curva na qual o fungo apresentou a menor fase de adaptação e a curva na qual o fungo apresentou a segunda menor fase de adaptação, representando a situação de maior risco para a indústria; uma vez que o produto é condenado quando o fungo se torna visível. As curvas de crescimento em função do tempo dos ensaios 1 ao 11 estão no Apêndice I.D.

A Tabela 4.60 mostra que houve diferença significativa entre as réplicas ($p < 0,05$) para os parâmetros duração da fase de adaptação (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e diâmetro máximo atingido pela colônia (A).

Tabela 4.60. Análise estatística da diferença entre as réplicas para os parâmetros λ , μ_{\max} e A de *B. nivea* em suco de mamão.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
λ	6109,1	2	3054,6	185,42	0,000719
μ_{\max}	0,047676	2	0,023838	448,06	0,000193
A	618,561	2	309,280	297,171	0,000356

A Tabela 4.61 mostra que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os modelos primários no ajuste aos dados experimentais para os parâmetros λ , μ_{\max} e A.

Tabela 4.61. Análise estatística da diferença entre os modelos para os parâmetros λ , μ_{\max} e A de *B. nivea* em suco de mamão.

Efeito	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F	p
λ	25,5	1	25,5	0,0166	0,903685
μ_{\max}	0,000018	1	0,000018	0,00151	0,970885
A	1,373	1	1,373	0,00885	0,929564

6.1. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DO MODELO DE GOMPERTZ MODIFICADO E DO MODELO LOGÍSTICO

A Tabela 4.62 apresenta os parâmetros estatísticos para avaliar o ajuste dos dois modelos primários empregados. Serão mostrados neste item apenas os valores para a primeira réplica escolhida. Os valores para a segunda réplica se encontram no Apêndice II.D.

Tabela 4.62. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Ensaio	Modelo	r^2	MSE	Bias	Exatidão
1	Gompertz	0,9970	0,07988	1,0451	1,0649
	Logístico	0,9987	0,03244	1,0139	1,0244
2	Gompertz	0,9995	0,02604	1,0015	1,0066
	Logístico	0,9986	0,07200	0,9977	1,0120
3	Gompertz	0,9767	0,70722	1,0177	1,0604
	Logístico	0,9702	0,89446	1,0259	1,0673
4	Gompertz	0,9860	0,46727	1,0169	1,0593
	Logístico	0,9859	0,45276	1,0245	1,0565
5	Gompertz	0,9946	0,43430	1,0097	1,0278
	Logístico	0,9950	0,39060	1,0037	1,0243
6	Gompertz	0,9954	0,00078	1,0040	1,0140
	Logístico	0,9947	0,00087	1,0067	1,0116
7	Gompertz	0,9864	0,30031	1,0092	1,0489
	Logístico	0,9779	0,49037	1,0148	1,0614
8	Gompertz	0,9933	0,27496	0,9923	1,0541
	Logístico	0,9903	0,37600	0,9917	1,0670
9	Gompertz	0,9979	0,76513	1,0039	1,0218
	Logístico	0,9953	1,71489	1,0051	1,0239
10	Gompertz	0,9927	0,45960	1,0088	1,0522
	Logístico	0,9899	0,62740	1,0061	1,0435
11	Gompertz	0,9903	2,00135	1,0070	1,0568
	Logístico	0,9887	2,25347	1,0126	1,0594

*Os valores em negrito indicam o modelo de melhor ajuste.

Como se pode observar pela análise da Tabela 4.62, os dois modelos se ajustaram bem aos dados experimentais, mas o Modelo de Gompertz Modificado se ajustou melhor (9 de 11 ensaios realizados); visto que o r^2 , o Fator Bias e o Fator de Exatidão foram mais próximos de 1 e o MSE mais próximo de zero. O mesmo ocorreu para a segunda réplica escolhida (ver Apêndice II.D).

Para melhor visualização da qualidade dos ajustes, estão apresentados nas Figuras 4.25(a) e 4.25(b), os valores de diâmetro da colônia observados experimentalmente contra os valores de diâmetro da colônia preditos pelos modelos de Gompertz Modificado e Logístico no crescimento de *B. nivea*, respectivamente. O Ensaio 2 foi escolhido aleatoriamente para a representação.

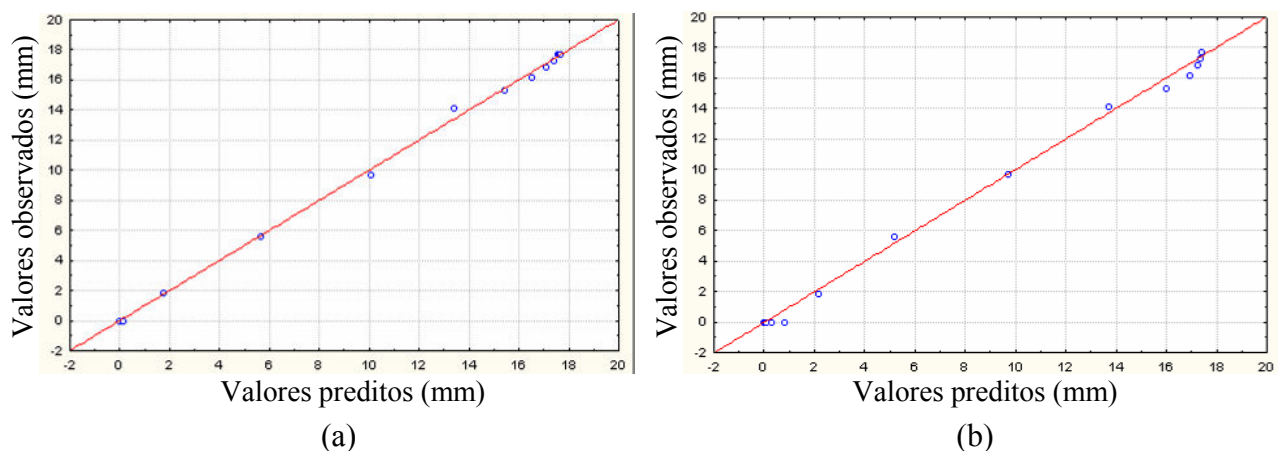


Figura 4.25. Valores de diâmetro observados versus valores de diâmetro preditos pelos modelos de Gompertz Modificado (a) e Logístico (b) para crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

As Figuras 4.25(a) e 4.25(b) mostram que os dados estão bem distribuídos na linha de equivalência.

6.2. PARÂMETROS PRIMÁRIOS DE CRESCIMENTO DE *Byssoschlamys nivea* EM SUCO DE MAMÃO

A Tabela 4.63 apresenta os parâmetros primários de crescimento λ , μ_{\max} e A e o tempo para a colônia atingir 3 mm.

Tabela 4.63. Parâmetros primários de crescimento obtidos pelo modelo de melhor ajuste no crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Ensaio	Réplica	λ (h)	μ_{\max} (mm/h)	A (mm)	Tempo para atingir 3 mm (h)
1	Réplica 1	296,6	0,24	12,6	307,7
	Réplica 2	319,3	0,33	13,8	328,2
2	Réplica 3	345,4	0,38	17,7	352,6
	Réplica 2	402,0	0,28	23,1	404,0
3	Réplica 2	184,0	0,10	17,8	212,9
	Réplica 3	197,6	0,17	23,9	211,7
4	Réplica 2	220,7	0,11	17,9	245,4
	Réplica 3	226,4	0,22	24,8	237,0
5	Réplica 2	381,0	0,23	23,7	382,7
	Réplica 3	524,1	0,05	3,6	596,5
6	Réplica 2	493,0	0,03	1,3	-
	Réplica 1	550,3	0,18	22,2	564,2
7	Réplica 1	180,4	0,09	12,1	215,2
	Réplica 2	199,6	0,12	15,8	224,0
8	Réplica 1	238,0	0,11	19,3	261,6
	Réplica 3	243,6	0,22	44,4	212,4
9	Réplica 2	171,2	0,69	41,5	171,9
	Réplica 4	174,4	0,51	49,3	173,4
10	Réplica 4	162,1	0,19	19,3	176,0
	Réplica 2	183,1	0,31	33,5	187,7
11	Réplica 3	205,9	0,22	37,9	210,3
	Réplica 2	231,6	0,43	11,9	238,6

No Ensaio 6, réplica 1, houve o maior tempo de adaptação (550,3 horas), nas condições: temperatura de formação dos esporos 35°C, temperatura de crescimento 22°C, *ratio* 66 e espaço livre 8%. Por outro lado, o menor tempo de adaptação (162,1 horas), ocorreu no Ensaio 10, réplica 4, na condição central do planejamento experimental; sendo esta a mais favorável ao crescimento do fungo. O menor tempo para a colônia atingir 3 mm, 171,9 horas, também foi obtido na condição

central do planejamento, porém no Ensaio 9, réplica 2. Este tempo significa que em 7,2 dias o produto seria rejeitado pelo consumidor, devido a observação visual da colônia do fungo. As condições dos pontos centrais do planejamento foram: temperatura de formação dos esporos 30°C, temperatura de crescimento 25°C, *ratio* 46 e espaço livre da garrafa 18%.

Este resultado sugere que nas condições mais estressantes para o fungo em termos de temperatura de crescimento (menor) e *ratio* (maior), houve um maior tempo de adaptação ao meio adverso.

A Figura 4.26 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor duração da fase de adaptação.

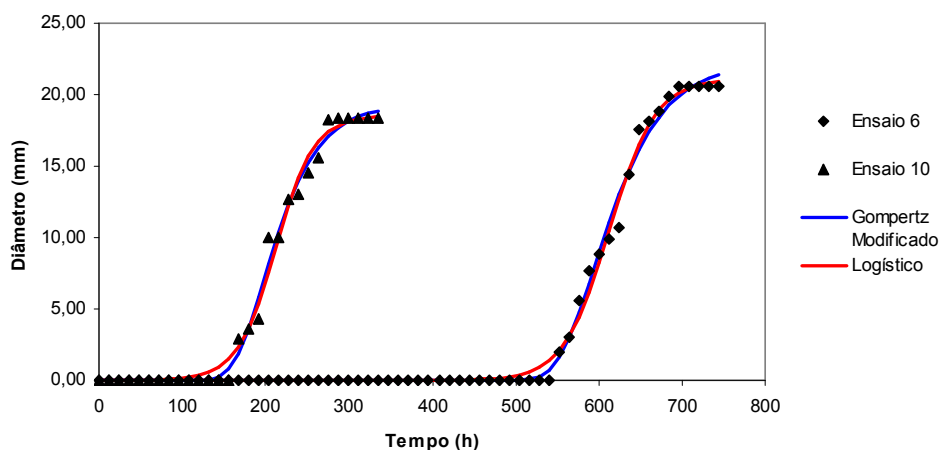


Figura 4.26. Comparação das curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o maior (6) e o menor (10) tempo de adaptação para *B. nivea* em suco de mamão.

No Ensaio 6, réplica 2, foi obtida a menor velocidade específica máxima de crescimento; o mesmo ensaio que teve a maior fase de adaptação. A maior velocidade específica máxima de crescimento foi observada no Ensaio 9, na condição central do planejamento experimental, sendo este resultado já esperado uma vez que a condição central favoreceu o desenvolvimento do fungo.

A Figura 4.27 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor velocidade específica máxima de crescimento.

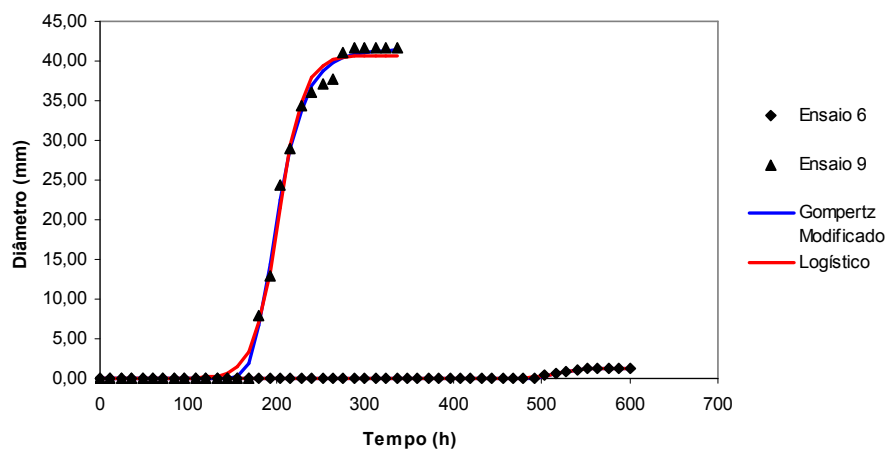


Figura 4.27. Comparação entre as curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram a maior (9) e a menor (6) velocidade específica máxima de crescimento para *B. nivea* em suco de mamão.

Com relação ao diâmetro máximo atingido pela colônia, o maior valor ocorreu no Ensaio 9, réplica 4, na condição central do planejamento experimental. O menor diâmetro máximo alcançado pela colônia ocorreu no Ensaio 6, réplica 2, o mesmo ensaio que apresentou a menor velocidade específica máxima de crescimento.

A Figura 4.28 apresenta uma comparação entre as curvas de crescimento correspondentes aos ensaios de maior e menor diâmetro máximo atingido pela colônia.

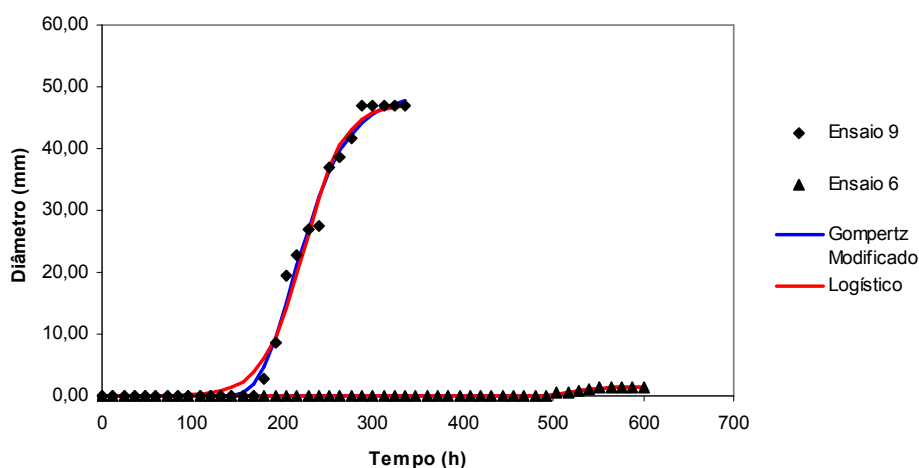


Figura 4.28. Comparação entre as curvas de crescimento dos ensaios que apresentaram o maior (9) e o menor (6) diâmetro máximo atingido pela colônia de *B. nivea* em suco de mamão.

A pior condição para o crescimento de *B. nivea* em suco de mamão foi aquela imposta pelo Ensaio 6, no qual houve um maior tempo de adaptação, menor velocidade específica máxima de crescimento e menor diâmetro máximo atingido pela colônia. Por outro lado, os pontos centrais do planejamento (Ensaio 9 e 10), foram os que apresentaram as melhores condições para desenvolvimento do fungo.

6.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EXPLORATÓRIO

Esta análise teve a finalidade de esclarecer quais foram os fatores, entre os quatro estudados, que afetaram significativamente os parâmetros de crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de mamão. Como o desenho experimental foi apenas exploratório não foi possível estabelecer nenhum modelo secundário que representasse com exatidão o efeito dos fatores ambientais nos parâmetros de crescimento do fungo. A análise foi realizada no *software* Statistica 6.0, utilizou como dados de entrada o desenho experimental e como variável resposta os valores de λ , μ_{\max} e A.

Antes da análise estatística, foi feito um estudo preliminar para avaliar, dentro de um ensaio, qual variável (λ , μ_{\max} ou A) entre as réplicas, tinha maior variabilidade. Este estudo foi feito desconsiderando-se os modelos. Calculou-se o desvio padrão, a média, o intervalo de confiança e o coeficiente de variação (Tabela 4.64).

Tabela 4.64. Média, desvio padrão, intervalo de confiança e coeficiente de variação para as variáveis resposta λ , μ_{\max} e A das quatro repetições no Ensaio 11 (escolhido aleatoriamente) para crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

	Média	Desvio Padrão	Intervalo de confiança (-95%)	Intervalo de confiança (+95%)	Coeficiente de Variação
λ	243,2 h	35,1	206,3 h	280,0 h	14,4%
μ_{\max}	0,36 mm/h	0,10	0,25 mm/h	0,46 mm/h	27,5%
A	23,8 mm	11,2	12,1 mm	35,5 mm	47,0%

*Coeficiente de Variação = (Desvio Padrão/Média)*100.

Pode-se concluir pela Tabela 4.64 que os valores de λ estão mais concentrados em torno da média (relação entre desvio padrão e média é igual a 14,4%). Por outro lado, os valores de A , possuem uma dispersão maior, onde essa relação é de 47,0%. Falhas nas medidas de diâmetro no início da fase estacionária e a escala de conversão da lupa podem ser possíveis explicações para este fato.

6.3.1. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em λ para crescimento de *B. nivea* em suco de mamão

A Tabela 4.65 mostra o desenho experimental e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 (primeira e segunda réplica).

Tabela 4.65. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta λ_1 e λ_2 para crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Ensaio	T_e	T	R	HS	$\lambda_1(\text{mm})$	$\lambda_2(\text{mm})$
1	-1	-1	-1	-1	296,6	319,3
2	+1	-1	-1	+1	345,4	402,0
3	-1	+1	-1	+1	184,0	197,6
4	+1	+1	-1	-1	220,7	226,4
5	-1	-1	+1	+1	381,0	524,1
6	+1	-1	+1	-1	493,0	550,3
7	-1	+1	+1	-1	180,4	199,6
8	+1	+1	+1	+1	238,0	243,6
9	0	0	0	0	171,2	174,4
10	0	0	0	0	162,1	183,1
11	0	0	0	0	205,9	231,6

Na Tabela 4.66, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores em λ_1 . O coeficiente de correlação (r^2) não foi inserido, pois não estava sendo avaliada a qualidade do ajuste do modelo e sim, quais foram os efeitos significativos.

Tabela 4.66. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em λ_1 para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	273,560	23,18242	11,80031	0,000022	216,834	330,2850
(1)T _e	100,652	46,50289	2,16443	0,073625	-13,136	214,4409
(2)T	-136,288	46,50289	-2,93073	0,026262	-250,076	-22,4991
(3)R	98,317	46,50289	2,11422	0,078911	-15,471	212,1059
(4)HS	26,327	46,50289	0,56615	0,591824	-87,461	140,1159

*IC = Intervalo de Confiança

A temperatura de crescimento do fungo (temperatura de incubação do suco) foi o único fator significativo a 95% de significância. O sinal negativo indica que ao aumentar a temperatura, diminui o tempo de adaptação da colônia. Estes resultados foram confirmados pelo Teste de Pareto.

Ao ignorar o efeito não significativo (espaço livre da garrafa), a temperatura de crescimento continuou significativa e a temperatura de formação dos esporos também se mostrou importante (Tabela 4.67).

Tabela 4.67. Efeitos estimados para os fatores T_e, T e R em λ_1 para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(7)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	235,1816	29,74950	7,90539	0,000098	164,8352	305,5280
(1)T _e	1,0247	0,42853	2,39112	0,048090	0,0114	2,0380
(2)T	-1,2983	0,42853	-3,02961	0,019125	-2,3116	-0,2850
(3)R	1,0018	0,42853	2,33770	0,052021	-0,0115	2,0151

*IC = Intervalo de Confiança

Pode-se concluir que para o fator λ (duração da fase de adaptação), a temperatura de crescimento foi o fator decisivo para o desenvolvimento de *B. nivea* em suco de mamão. O fator temperatura de formação dos esporos também se mostrou importante, pois quanto maior a temperatura, maior a dormência do fungo e maior o tempo de adaptação. Esta característica de dormência é típica de microrganismos termorresistentes.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para λ_2 na Tabela 4.65).

Na Tabela 4.68, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores em λ_2 .

Tabela 4.68. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em λ_2 para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	309,752	29,53548	10,48744	0,000044	237,481	382,0223
(1)T _e	90,756	59,24683	1,53182	0,176450	-54,216	235,7273
(2)T	-186,774	59,24683	-3,15248	0,019752	-331,746	-41,8027
(3)R	138,416	59,24683	2,33625	0,058141	-6,556	283,3873
(4)HS	63,206	59,24683	1,06682	0,327087	-81,766	208,1773

*IC = Intervalo de Confiança

Novamente a temperatura de crescimento foi o fator significativo a 95% de significância. Estes resultados foram confirmados pelo Teste de Pareto.

Ao ignorar os efeitos de menor importância (T_e e HS), a temperatura de crescimento continuou significativa e o *ratio* também se mostrou importante (Tabela 4.69).

Tabela 4.69. Efeitos estimados e valores de probabilidades para os fatores T e R em λ_2 para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(8)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	293,9951	41,98734	7,00199	0,000112	197,1721	390,8181
(2)T	-1,5715	0,63444	-2,47707	0,038286	-3,0346	-0,1085
(3)R	1,6166	0,63444	2,54809	0,034276	0,1536	3,0796

*IC = Intervalo de Confiança

Estes resultados, em relação à temperatura de crescimento, confirmam a análise da primeira réplica. Porém, na primeira réplica havia aparecido a temperatura de formação dos esporos como significativo, e nesta segunda réplica, apareceu o *ratio* como uma influência positiva. Quanto

maior o *ratio*, maior a quantidade de açúcar no meio e maior o tempo de adaptação. Isto se deve à barreira causada pela baixa atividade de água.

Cunha (2003), estudando o crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi e suco de maracujá a 20°C e 30°C, observou que ao aumentar a temperatura, a duração da fase lag passou de 97,33 horas para 24,24 horas no suco de maracujá. O método para medida do crescimento utilizado foi o da diluição e plaqueamento e o modelo utilizado no ajuste das curvas foi o de Gompertz Modificado.

6.3.2. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em μ_{\max} para crescimento de *B. nivea* em suco de mamão

Na Tabela 4.70, apresenta-se o desenho experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max1}$ e $\mu_{\max2}$. Trata-se da primeira e segunda réplica.

Tabela 4.70. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta $\mu_{\max1}$ e $\mu_{\max2}$ para *B. nivea* em suco de mamão.

Ensaio	T_e	T	R	HS	$\mu_{\max1}(\text{mm/h})$	$\mu_{\max2}(\text{mm/h})$
1	-1	-1	-1	-1	0,24	0,33
2	+1	-1	-1	+1	0,38	0,28
3	-1	+1	-1	+1	0,10	0,17
4	+1	+1	-1	-1	0,11	0,22
5	-1	-1	+1	+1	0,23	0,05
6	+1	-1	+1	-1	0,03	0,18
7	-1	+1	+1	-1	0,09	0,12
8	+1	+1	+1	+1	0,11	0,22
9	0	0	0	0	0,69	0,51
10	0	0	0	0	0,19	0,31
11	0	0	0	0	0,22	0,43

Na Tabela 4.71, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em $\mu_{\max1}$.

Tabela 4.71. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 1}$ para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,180011	0,061729	2,91613	0,026766	0,028964	0,331058
(1)T _e	-0,040150	0,123827	-0,32425	0,756756	-0,343143	0,262842
(2)T	-0,155750	0,123827	-1,25781	0,255196	-0,458743	0,147242
(3)R	-0,132850	0,123827	-1,07288	0,324571	-0,435843	0,170142
(4)HS	0,050850	0,123827	0,41065	0,695591	-0,252143	0,353842

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Foi analisado também 90% de significância, mas os fatores continuaram não influenciando.

Pode-se concluir que além dos fatores estudados, existem outros que influenciam a velocidade específica máxima de crescimento do fungo, uma vez que nenhum deles foi significativo nos níveis estudados. Outra hipótese seria que o planejamento experimental não foi suficientemente discriminativo para selecionar os fatores importantes.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para $\mu_{\max 2}$ na Tabela 4.70).

Na Tabela 4.72, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em $\mu_{\max 2}$.

Tabela 4.72. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em $\mu_{\max 2}$ para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,217872	0,035915	6,06627	0,000910	0,129990	0,305753
(1)T _e	0,013738	0,072044	0,19068	0,855061	-0,162548	0,190024
(2)T	-0,071612	0,072044	-0,99400	0,358602	-0,247898	0,104674
(3)R	-0,150362	0,072044	-2,08708	0,081928	-0,326648	0,025924
(4)HS	-0,076012	0,072044	-1,05508	0,332011	-0,252298	0,100274

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância.

Ao ignorar os efeitos de menor importância (HS, T e T_e), o *ratio* se tornou significativo (Tabela 4.73).

Tabela 4.73. Efeitos estimados para o *ratio* em $\mu_{\max 2}$ para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	0,319391	0,039827	8,01949	0,000022	0,229297	0,409486
(3)R	-0,001747	0,000654	-2,67137	0,025565	-0,003226	-0,000268

*IC = Intervalo de Confiança

Este resultado é diferente da análise da primeira réplica, mostrando que a diferença entre cada réplica do mesmo ensaio é significativa.

O aumento do *ratio* reduziu a a_w do suco, devido a alta quantidade de açúcar, diminuindo assim a velocidade específica máxima de crescimento do fungo (sinal negativo no parâmetro). Este fato está de acordo com relatos da literatura (Gibson et al., 1994 e Valík & Piecková, 2001).

6.3.3. Efeito da temperatura de formação dos esporos, temperatura de crescimento, *ratio* do suco e espaço livre da garrafa em A para crescimento de *B. nivea* em suco de mamão

A Tabela 4.74 apresenta o planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A_1 e A_2 (primeira e segunda réplica).

Tabela 4.74. Planejamento experimental codificado e as variáveis resposta A_1 e A_2 para *B. nivea* em suco de mamão.

Ensaio	T_e	T	R	HS	A_1 (mm)	A_2 (mm)
1	-1	-1	-1	-1	12,6	13,8
2	+1	-1	-1	+1	17,7	23,1
3	-1	+1	-1	+1	17,8	23,9
4	+1	+1	-1	-1	17,9	24,8
5	-1	-1	+1	+1	23,7	3,6
6	+1	-1	+1	-1	1,3	22,2
7	-1	+1	+1	-1	12,1	15,8
8	+1	+1	+1	+1	19,3	44,4
9	0	0	0	0	41,5	49,3
10	0	0	0	0	19,3	33,5
11	0	0	0	0	37,9	11,9

Na Tabela 4.75, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores independentes em A_1 para crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Tabela 4.75. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_1 para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	18,07843	3,971769	4,55173	0,003885	8,3599	27,79700
(1) T_e	-7,97294	7,967190	-1,00072	0,355596	-27,4680	11,52207
(2)T	-2,53294	7,967190	-0,31792	0,761318	-22,0280	16,96207
(3)R	-7,84794	7,967190	-0,98503	0,362647	-27,3430	11,64707
(4)HS	3,21206	7,967190	0,40316	0,700803	-16,2830	22,70707

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. O nível de significância de 90% também foi avaliado, porém nenhum fator se tornou significativo.

Pode-se concluir que além dos fatores estudados, existem outros que permitem o desenvolvimento do fungo, uma vez que nenhum deles foi significativo nos níveis estudados.

Para confirmar este resultado, foi analisada a segunda réplica de cada ensaio (Desenho Experimental para A_2 na Tabela 4.74).

Na Tabela 4.76, encontram-se os efeitos estimados para cada um dos fatores em A_2 .

Tabela 4.76. Efeitos estimados e valores de probabilidade para os fatores independentes em A_2 para *B. nivea* em suco de mamão.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p	IC* (-95%)	IC (+95%)
Intercepto	24,80686	5,39398	4,598993	0,003696	11,6083	38,00545
(1) T_e	7,83243	10,82007	0,723880	0,496381	-18,6433	34,30820
(2) T	4,98243	10,82007	0,460480	0,661389	-21,4933	31,45820
(3) R	-6,46757	10,82007	-0,597738	0,571869	-32,9433	20,00820
(4) HS	-1,95757	10,82007	-0,180920	0,862387	-28,4333	24,51820

*IC = Intervalo de Confiança

Nenhum dos fatores foi significativo a 95% de significância. Também foi avaliado 90% de significância, porém todos os fatores continuaram irrelevantes.

Estes resultados confirmam a análise da primeira réplica.

Este parâmetro não está diretamente relacionado com os fatores estudados e sua interpretação é de difícil explicação. Pode estar relacionado a fatores implícitos do fungo, tal como a liberação de metabólitos secundários que podem influenciar no crescimento das colônias vizinhas. Outro motivo pode ser a ocorrência de falhas nas medidas de diâmetro da colônia individual; uma vez que em alguns ensaios as colônias se juntaram e era difícil medir o início de cada colônia.

Cunha (2003), ao estudar o crescimento de *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi e suco de maracujá a 20°C e 30°C, observou que ao aumentar a temperatura, o valor do parâmetro A passou de 3,25 para 3,77 no suco de maracujá. O método para medida do crescimento utilizado foi o da diluição e plaqueamento e o modelo utilizado no ajuste das curvas foi o de Gompertz Modificado.

7. COMPARAÇÃO ENTRE *Neosartorya fischeri* E *Byssoschlamys nivea* NOS DOIS MEIOS DE CRESCIMENTO TESTADOS

A Tabela 4.77 apresenta os maiores e menores valores obtidos para os parâmetros primários de crescimento de *Neosartorya fischeri* e *Byssoschlamys nivea* em suco de abacaxi e suco de mamão. Os parâmetros são aqueles estimados pelo modelo de melhor ajuste.

Tabela 4.77. Maiores e menores valores para os parâmetros primários de crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea* em suco de abacaxi e suco de mamão.

Suco	Fungo	λ (h)		μ_{\max} (mm/h)		A (mm)	
		Maior	Menor	Maior	Menor	Maior	Menor
Abacaxi	<i>N. fischeri</i>	381,7 (6)*	74,1 (7)	0,69 (7)	0,13 (5)	41,2 (11)	9,3 (4)
	<i>B. nivea</i>	726,7 (4)	185,1 (7)	1,25 (3)	0,09 (5)	48,5 (6)	2,2 (5)
Mamão	<i>N. fischeri</i>	708,4 (6)	93,7 (10)	0,73 (8)	0,18 (10)	45,4 (7)	12,7 (4)
	<i>B. nivea</i>	550,3 (6)	162,1(10)	0,69 (9)	0,03 (6)	49,3 (9)	1,3 (6)

*Os números entre parêntesis referem-se ao número do Ensaio no qual o valor foi obtido.

Comparando o crescimento de *N. fischeri* e de *B. nivea* em suco de abacaxi pode-se observar que:

- O Ensaio 7 (temperatura de formação dos esporos = 25°C, temperatura de crescimento = 28°C, *ratio* = 38 e espaço livre da garrafa = 8%) foi o que apresentou a menor duração da fase de adaptação;
- O Ensaio 5 (temperatura de formação dos esporos = 25°C, temperatura de crescimento = 22°C, *ratio* = 38 e espaço livre da garrafa = 28%) foi o que apresentou a menor velocidade específica máxima de crescimento;
- A maior velocidade específica máxima de crescimento ocorreu em ensaios com menor temperatura de formação dos esporos e maior temperatura de crescimento;
- O maior tempo de adaptação ocorreu em ensaios com maior temperatura de formação dos esporos e menor espaço livre da garrafa;

- O fungo *N. fischeri* apresentou menor duração da fase de adaptação em relação ao *B. nivea*; porém este apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento e o maior diâmetro máximo atingido pela colônia.

Segundo Cunha (2003), o crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi a 30°C, apresentou um menor valor para o parâmetro A, quando comparado à curva de crescimento de *B. nivea*, nas mesmas condições.

A Figura 4.29 apresenta um exemplo de ensaio utilizando o suco de abacaxi como meio de crescimento para *N. fischeri* e *B. nivea* (o suporte de madeira somente foi utilizado para leitura na lupa, por se ajustar melhor embaixo da mesma).

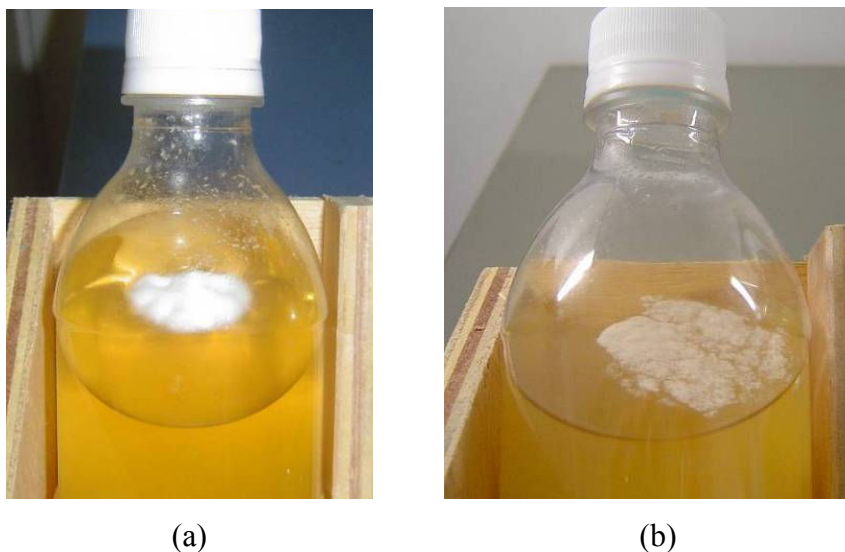


Figura 4.29. Crescimento de (a) *N. fischeri* e (b) *B. nivea* em suco de abacaxi.

Uma diferença nítida que pode ser observada a partir da Figura 4.29 é a diferença na cor e formato das colônias. A colônia de *N. fischeri* é branca, umbonada, bem definida e com aspecto cottonoso; enquanto a colônia de *B. nivea* é amarelada, tendendo a marrom, espalhada, com formato mais irregular, o que dificulta a precisão das medidas de diâmetro, e com aspecto mais firme. Outra característica marcante da diferença entre os fungos é que o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi provocou a gelificação do meio (visível na Figura 4.29), formação de gás e odor desagradável. O crescimento de *N. fischeri* gerou uma leve clarificação do suco, devido à separação de fases (polpa e suco) e um odor levemente amoniacal.

Comparando o comportamento de *N. fischeri* e de *B. nivea* em suco de mamão (Tabela 4.77), observa-se que:

- O Ensaio 6 (temperatura de formação dos esporos = 35°C, temperatura de crescimento = 22°C, *ratio* = 66 e espaço livre da garrafa = 8%) apresentou o maior tempo de adaptação;
- A condição central do planejamento, Ensaio 10 (temperatura de formação dos esporos = 30°C, temperatura de crescimento = 25°C, *ratio* = 46 e espaço livre da garrafa = 18%), apresentou o menor tempo de adaptação;
- O menor diâmetro máximo atingido pela colônia ocorreu em ensaios com maior temperatura de formação dos esporos e menor espaço livre da garrafa;
- O fungo *N. fischeri* apresentou menor tempo de adaptação e maior velocidade específica máxima de crescimento em relação ao *B. nivea*; porém este apresentou o maior diâmetro máximo atingido pela colônia.

A Figura 4.30 apresenta um exemplo de ensaio utilizando o suco de mamão como meio de crescimento para *N. fischeri* e *B. nivea* (o suporte de madeira somente foi utilizado para leitura na lupa, por se ajustar melhor embaixo da mesma).

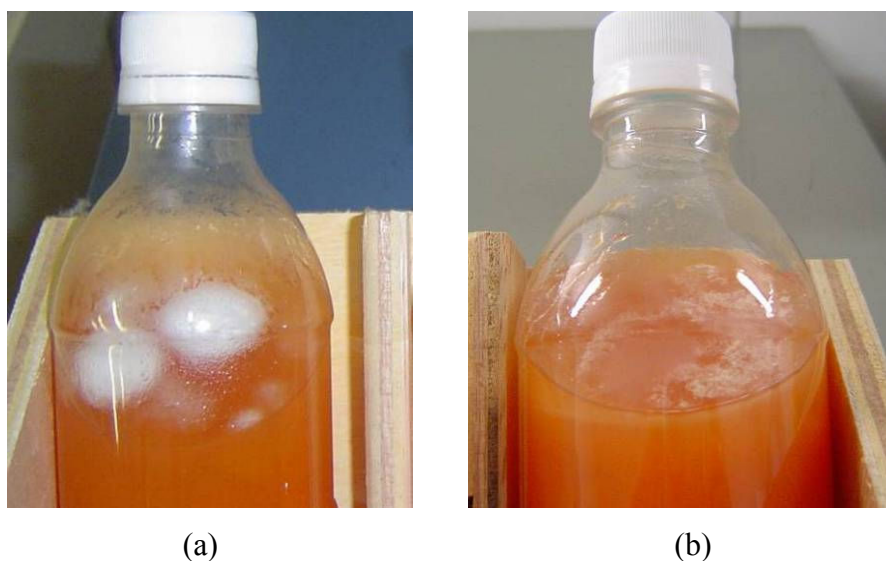


Figura 4.30. Crescimento de (a) *N. fischeri* e (b) de *B. nivea* em suco de mamão.

Pela análise da Figura 4.30 pode-se notar que a colônia de *N. fischeri* é branca, bem definida e com aspecto cottonoso; enquanto a colônia de *B. nivea* é amarelada, tendendo a marrom

e com formato irregular. Uma característica marcante da diferença entre os fungos é que o crescimento de *B. nivea* em suco de mamão provoca a gelificação do meio (visível na Figura 4.30), formação de gás e odor desagradável; enquanto o crescimento de *N. fischeri* gerou um odor levemente amoniacal.

Ao avaliar o crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi e em suco de mamão (Tabela 4.77), pode-se analisar que:

- O Ensaio 6 (temperatura de formação dos esporos = 35°C, temperatura de crescimento = 22°C, *ratio* = 38 (abacaxi) e 66 (mamão) e espaço livre da garrafa = 8%) foi o que apresentou o maior tempo de adaptação;
- O Ensaio 4 (temperatura de formação dos esporos = 35°C, temperatura de crescimento = 28°C, *ratio* = 10 (abacaxi) e 26 (mamão) e espaço livre da garrafa = 8%) foi o que apresentou o menor diâmetro máximo atingido pela colônia;
- A maior velocidade específica máxima de crescimento foi obtida em ensaios com a maior temperatura de incubação do suco e o maior *ratio*;
- O fungo *N. fischeri* apresentou o menor tempo de adaptação em suco de abacaxi; porém apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento e o maior diâmetro máximo atingido pela colônia no suco de mamão.

A Figura 4.31 apresenta um exemplo de ensaio utilizando o suco de abacaxi e o suco de mamão como meio de crescimento para *N. fischeri* (o suporte de madeira somente foi utilizado para leitura na lupa, por se ajustar melhor embaixo da mesma).

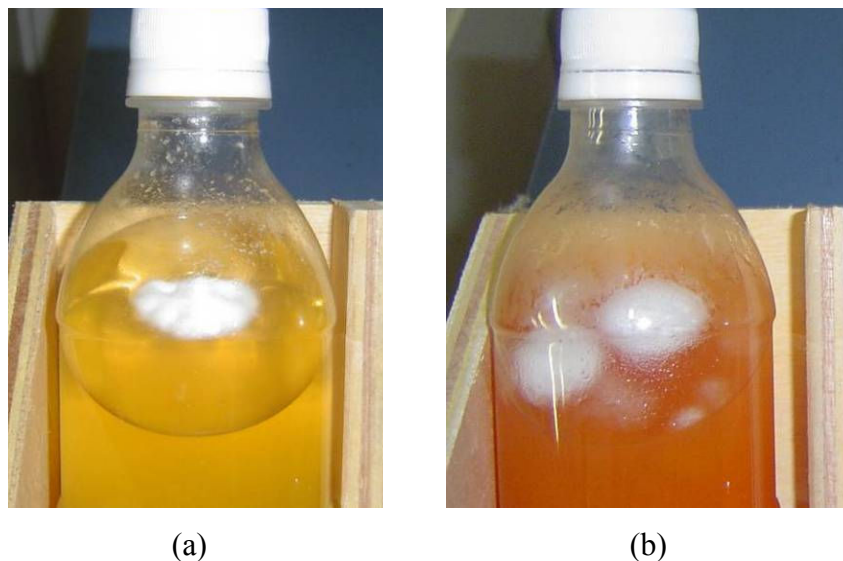


Figura 4.31. Crescimento de *N. fischeri* em (a) suco de abacaxi e (b) suco de mamão.

Através análise da Figura 4.31 pode-se observar que a colônia de *N. fischeri* em suco de abacaxi é umbonada; enquanto a colônia em suco de mamão é completamente plana. Outra característica relevante é que em suco de abacaxi houve o crescimento de uma única colônia; enquanto no suco de mamão várias colônias se desenvolveram na superfície do suco. O crescimento de *N. fischeri* gerou um odor levemente amoniacal nos dois sucos e no suco de abacaxi houve uma separação de fases possivelmente devido a ação de enzimas pectinolíticas.

Baglioni (1998) reportou a deterioração causada por uma cepa de *N. fischeri* em polpa de tomate (8°Brix). Após um mês de incubação a 30°C, houve escurecimento devido à produção de pigmento escuro pelo fungo, separação de fases (soro e polpa), diminuição na viscosidade do produto indicando a produção de enzimas pectinolíticas, alcalinização da polpa (o pH inicial era 4,3 e subiu para 8,99) e liberação de odor levemente amoniacal. Salomão (2002), em estudo para avaliar a deterioração causada por *N. fischeri* em suco de maçã, verificou a mudança do aspecto do suco, que se clarificou. Esta clarificação provavelmente ocorreu pela ação de enzimas pectinolíticas desenvolvidas pelo fungo.

Por fim, ao analisar a Tabela 4.77 para *B. nivea* em suco de abacaxi e suco de mamão, observa-se que:

- A maior duração da fase de adaptação ocorreu em ensaios com a maior temperatura de formação dos esporos e o menor espaço livre da garrafa;

- A menor velocidade específica máxima de crescimento e o menor diâmetro máximo atingido pela colônia ocorreram em ensaios com a menor temperatura de crescimento e o maior *ratio*;
- O fungo *B. nivea* apresentou menor duração da fase de adaptação e maior diâmetro máximo atingido pela colônia em suco de mamão; porém apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento em suco de abacaxi.

A Figura 4.32 apresenta um exemplo de ensaio utilizando o suco de abacaxi e o suco de mamão como meio de crescimento para *B. nivea* (o suporte de madeira somente foi utilizado para leitura na lupa, por se ajustar melhor embaixo da mesma).

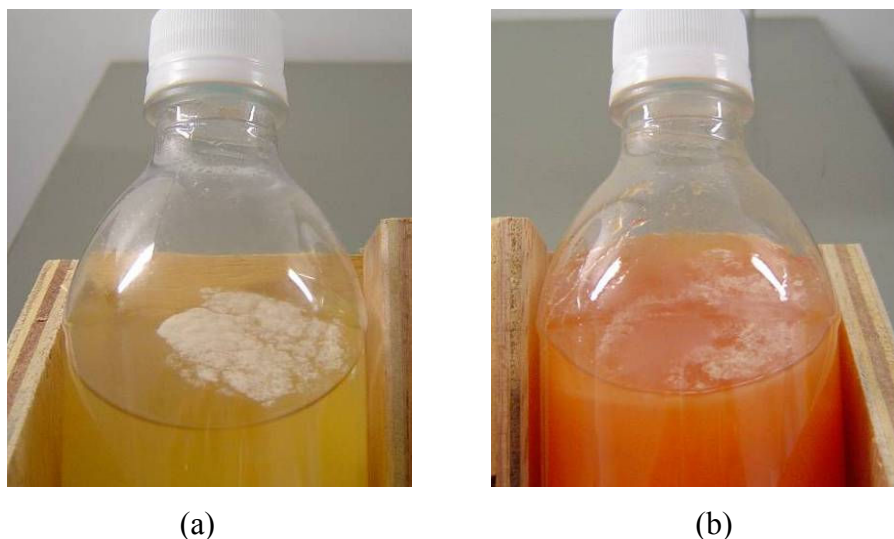


Figura 4.32. Crescimento de *B. nivea* em (a) suco de abacaxi e (b) suco de mamão.

Através análise da Figura 4.32 pode-se notar que as colônias de *B. nivea* em suco de abacaxi apresentaram-se mais restritas em uma parte da superfície; enquanto no suco de mamão, as colônias se espalharam, distribuindo-se em toda a superfície. Outra característica importante é que o crescimento de *B. nivea* gerou uma produção de gás e odor desagradável nos dois sucos e no suco de mamão houve uma maior gelificação do meio.

De acordo com Hocking & Pitt (1984), em produtos líquidos infectados por fungos do gênero *Byssoschlamys*, sob baixas tensões de oxigênio, ocorre fermentação com produção de CO₂, gerando estufamento nas embalagens e visível deterioração. Aragão (1989), estudando a

deterioração causada por *B. nivea*, *N. fischeri*, *T. flavus* e *E. javanicum* em suco de morango, observou que a única espécie que apresentou produção de gás foi o *B. nivea*.

8. COMPARAÇÃO ENTRE *Neosartorya fischeri* E *Byssochlamys nivea* EM TERMOS DE FATORES SIGNIFICATIVOS

Na Tabela 4.78, apresenta-se um resumo dos fatores significativos nos parâmetros biológicos λ , μ_{\max} e A.

Tabela 4.78. Resumo dos parâmetros significativos para λ , μ_{\max} e A para ambos os fungos a 95% de significância.

Suco	Bolores	λ (h)		μ_{\max} (mm/h)		A (mm)	
		Réplicas		Réplicas		Réplicas	
		Primeira	Segunda	Primeira	Segunda	Primeira	Segunda
Abacaxi	<i>N. fischeri</i>	T _e , T	T _e , T	T	T _e , T, R	-	T _e
	<i>B. nivea</i>	-	-	-	-	R*	-
Mamão	<i>N. fischeri</i>	T	T	R	R	T	R
	<i>B. nivea</i>	T _e , T	T, R	-	R	-	-

*90% de significância, - nenhum fator significativo

Pode-se observar pela Tabela 4.78, que para a duração da fase de adaptação λ , o fator mais freqüentemente significativo, em ambas as réplicas e para ambos os fungos foi a temperatura de crescimento. No caso de *N. fischeri* em suco de abacaxi, a temperatura de formação dos esporos T_e também foi significativa para λ ; este fato pode estar relacionado com a dormência de seus esporos. Entretanto, isto não foi observado para o suco de mamão com o mesmo fungo. Para *B. nivea*, em suco de abacaxi nenhum dos fatores pareceu ter um efeito significativo em λ ; entretanto, para este mesmo fungo, quando inoculado em suco de mamão, o *ratio* foi significativo. Cabe salientar que, considerando a forma irregular da colônia de *B. nivea*, algumas das medidas de diâmetro podem não ter sido muito precisas.

A partir da Tabela 4.78, acima apresentada, pode-se concluir que o parâmetro mais freqüentemente significativo na velocidade específica máxima de crescimento foi o *ratio*, seguido

da temperatura de crescimento, e, no caso de *N. fischeri*, a temperatura de formação dos esporos. Com relação ao diâmetro máximo A, tanto a temperatura de crescimento T, quanto a temperatura de formação dos esporos T_e e o *ratio* R do suco foram significativos.

Este método (medida de diâmetro) foi melhor adaptado para o crescimento de *N. fischeri*, devido as características da colônia deste fungo (inicia o crescimento na superfície e colônias bem definidas). O método apresentou dificuldades para mensurar a colônia de *B. nivea*, primeiramente por este iniciar o crescimento no fundo da garrafa, gelificar o meio e só então ir para a superfície (característica comum a microrganismos microaerófilos). Outro motivo é o fato da colônia deste fungo não ser completamente definida em suas extremidades.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

Dos três métodos utilizados para acompanhar o crescimento de fungos, apenas o método de medida do diâmetro da colônia mostrou-se adequado para monitorar todas as fases do crescimento de *Neosartorya fischeri* e *Byssoschlamys nivea*, apresentando resultados reprodutíveis.

Com relação aos modelos primários avaliados, ambos descreveram muito bem o crescimento de fungos termorresistentes; entretanto, o Modelo de Gompertz Modificado ajustou-se melhor do que o Modelo Logístico na maioria dos ensaios realizados.

Na avaliação do efeito da temperatura de incubação do suco no crescimento de *N. fischeri* e *B. nivea* em suco de abacaxi, o Modelo da Raiz Quadrada, descreveu bem o efeito da temperatura de estocagem do suco sobre os parâmetros de crescimento. Houve um aumento da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e uma diminuição da duração da fase de adaptação (λ) com o aumento da temperatura para ambos os fungos. Porém, com relação ao diâmetro máximo atingido pela colônia (A), este aumentou com o aumento da temperatura para *N. fischeri*; enquanto para *B. nivea* não houve ajuste do modelo em relação aos dados experimentais. As equações obtidas são de utilidade prática para a indústria.

A análise do Planejamento Experimental Exploratório mostrou que, para o crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, a temperatura de formação dos esporos foi um parâmetro significativo na duração da fase de adaptação (λ), na velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e no diâmetro máximo atingido pela colônia (A). Este fato é relevante, pois este fungo é reconhecido como o mais termorresistente dos bolores. A temperatura de incubação do suco influenciou nos parâmetros λ e μ_{\max} ; enquanto o *ratio*, só se mostrou significativo na velocidade específica máxima de crescimento. A análise do Planejamento Experimental para o mesmo fungo em suco de mamão, mostrou que o *ratio* influenciou nos parâmetros μ_{\max} e A e a temperatura de estocagem do suco influenciou significativamente em λ e A. O espaço livre não se mostrou significativo para o desenvolvimento de *N. fischeri* em nenhuma análise.

A análise do Planejamento Experimental Exploratório mostrou que, para o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, os fatores estudados não se mostraram relevantes a um nível de significância de 95%. A 90% de significância, o *ratio* se mostrou importante no parâmetro A. Para

o suco de mamão, a análise do Planejamento Experimental para o crescimento do mesmo fungo mostrou que o fator estudado mais relevante na duração da fase de adaptação foi a temperatura de crescimento. Porém, a temperatura de formação dos esporos e o *ratio*, quando analisados sem as variáveis de menor importância, também se mostraram relevantes. O *ratio* mostrou influência também na velocidade específica máxima de crescimento. O espaço livre, assim como para *N. fischeri*, não foi significativo na faixa estudada.

As diferenças morfológicas observadas entre as colônias de *N. fischeri* e *B. nivea* foram: a primeira é bem definida e com aspecto cotonoso; enquanto a segunda é espalhada e de formato irregular, tendo este fato contribuído para dificultar o acompanhamento do crescimento pela medida do diâmetro da colônia para este fungo.

Com relação ao crescimento nos sucos avaliados, o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi e em suco de mamão provocou a gelificação do meio, produção de gás e odor desagradável; enquanto o crescimento de *N. fischeri* gerou uma leve clarificação do suco, devido à separação de fases em suco de abacaxi e um odor levemente amoniacal em ambos os sucos.

Comparando o crescimento de *N. fischeri* e de *B. nivea* em suco de abacaxi, pode-se concluir que: o fungo *N. fischeri* apresentou a menor duração da fase de adaptação em relação ao *B. nivea* porém este apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento e o maior diâmetro máximo atingido pela colônia. Em termos da melhor situação para a indústria (maior controle destes fungos), o maior tempo de adaptação ocorreu em ensaios com maior temperatura de formação dos esporos (35°C) e menor espaço livre da garrafa (8%) para *N. fischeri* e para *B. nivea*. Os tempos de adaptação registrados, no entanto, foram inferiores àqueles fornecidos pelo fabricante, sugerindo a necessidade de barreiras mais efetivas de controle, mesmo porque o processador desconhece a temperatura de formação dos esporos dos fungos presentes em seu produto.

Em relação ao comportamento de *N. fischeri* e de *B. nivea* em suco de mamão, conclui-se que: o fungo *N. fischeri* apresentou a menor duração da fase de adaptação e a maior velocidade específica máxima de crescimento em relação ao *B. nivea*, porém este apresentou o maior diâmetro

máximo atingido pela colônia. O maior tempo de adaptação ocorreu no ensaio com a maior temperatura de formação dos esporos (35°C), a menor temperatura de crescimento (22°C), maior *ratio* (66) e menor espaço livre da garrafa (8%).

Ao avaliar o crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi e em suco de mamão, pode-se concluir que o fungo apresentou a menor duração da fase de adaptação em suco de abacaxi; porém apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento e o maior diâmetro máximo atingido pela colônia no suco de mamão. Para fins de controle, cabe salientar que o maior tempo de adaptação ocorreu no ensaio com a maior temperatura de formação dos esporos (35°C), a menor temperatura de crescimento (22°C), maior *ratio* (38 para abacaxi e 66 para mamão) e menor espaço livre da garrafa (8%).

Por fim, ao analisar o crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi e em suco de mamão, conclui-se que o fungo apresentou a menor duração da fase de adaptação e o maior diâmetro máximo atingido pela colônia em suco de mamão; porém apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento em suco de abacaxi. O maior tempo de adaptação ocorreu em ensaios com a maior temperatura de formação dos esporos (35°C) e o menor espaço livre da garrafa (8%).

A importância dos fatores para o crescimento superficial depende muito do suco no qual o fungo está inoculado, sua composição, nutrientes disponíveis e da habilidade do fungo de desenvolver sua forma aérea micelial. Justamente por isso, o método da medida de diâmetro foi melhor adaptado para o crescimento de *N. fischeri*, devido às características da colônia deste fungo (inicia o crescimento na superfície e colônias bem definidas). O método apresentou dificuldades para mensurar a colônia de *B. nivea*, primeiramente por este iniciar o crescimento no fundo da garrafa, gelificar o meio e só então ir para a superfície (característica comum a microrganismos microaerófilos). Outro motivo é o fato da colônia deste fungo não ter um contorno bem definido.

CAPÍTULO VI
SUGESTÕES

Primeiramente, é indispensável que as indústrias de processamento de sucos realizem uma boa seleção, lavagem e sanitização das matérias primas, com o propósito de eliminar aquelas danificadas ou apodrecidas, pois são estas que vinculam os fungos termorresistentes.

Outra providência adequada seria uma boa condição asséptica do ambiente, equipamentos e embalagens podendo assim reduzir a incidência de contaminantes, como fungos filamentosos, fungos filamentosos termorresistentes e bactérias.

Com relação à pesquisa realizada, para uma avaliação melhor do crescimento dos fungos, seria necessária a análise de outros níveis dos fatores estudados, por exemplo, mais próximos à região cresce/não cresce do fungo ou a análise de outros fatores relativos à composição do suco, que possam influenciar o crescimento. Para a realização de uma análise mais completa dos fatores, uma nova pesquisa poderia utilizar o Planejamento Experimental Central Composto para permitir a criação de uma superfície de resposta.

Outros métodos devem ser pesquisados para medir o crescimento de fungos que não dependam da transparência da embalagem nem do crescimento superficial dos mesmos, tais como análise dos componentes de parede celular, quantificação de metabólitos secundários ou enzimas produzidas.

CAPÍTULO VII
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE REFRIGERANTES E DE BEBIDAS NÃO ALCÓOLICAS. A Indústria de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas do Brasil, 2007. http://www.abir.org.br/rubrique.php3?id_rubrique=141.

AKPOMEDAYE, D.E. & EJECHI, B.O. The hurdle effect of mild heat and two tropical spice extracts on the growth of three fungi in fruit juices. **Food Research International**, v.31, n.5, p.339-341, 1998.

ALAVI, S.H., PURI, V.M., KNABEL, S.J., MOHTAR, R.H., WHITING, R.C. Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid milk. **Journal of Food Protection**, v.62, p.170-176, 1999.

ALMONACID-MERINO, S.F. & TORRES, J.A. Mathematical models to evaluate temperature abuse effects during distribution of refrigerated solid food. **Journal of Food Engineering**, v.20, p.223-225, 1993.

ARAGÃO, G.M.F. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes isolados da polpa de morango. Campinas, 1989. 139p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

AUGUSTIN, J.-C., BROUILLAUD-DELATTRE, A., ROSSO, L., CARLIER, V. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p.1706-1710, 2000.

AUGUSTIN, J.C.; ROSSO, L. & CARLIER, V. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v.38, p.137-146, 1999.

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. Campinas, 1998, 94p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

BARANYI, J & ROBERTS, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, p.199-218, 1995.

BARANYI, J & ROBERTS, T.A. Review paper. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.277-294, 1994.

BARANYI, J.; GIBSON, A.M.; PITT, J.I.; EYLES, M.J. & ROBERTS, T.A. Predictive models as means of measuring the relatedness of some *Aspergillus* species. **Food Microbiology**, v.14, p.347-351, 1996.

BATY, F. e DELIGNETTE-MULLER, M.-L. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.261-277, 2004.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J.D.; LABADIE, J.C. & LEBERT, A. Recommendations of calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v.25, p.225-232, 1996.

BEUCHAT, L.R. Survival of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* ascospores in fruit powders. **Letters of Applied Microbiology**, v.14, p.238-240, 1992.

BEUCHAT, L.R. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. **Journal of Food Science**, v.51, n.6, p.1506-1510, 1986.

BEUCHAT, L.R. & RICE, S.L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-289, 1979.

BEUCHAT, L.R. & TOLEDO, R.T. Behavior of *Byssochlamys nivea* ascospores in fruit syrups. **Transactions of British Mycological Society**, v.68, n.1, p.65-71, 1977.

BRATCHELL, N.; GIBSON, A.M.; TRUMAN, M.; KELLY, T.M. & ROBERTS, T.A. Predicting microbial growth: the consequences of quality data. **International Journal of Food Microbiology**, v.8, p.47, 1989.

BUCHANAN, R.L. Developing and distributing user-friendly application software. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.251-255, 1993.

BUCHANAN, R.L. & KLAWITTER, L.A. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.235-246, 1991.

BUCHANAN, R.L. & CYGNAROWICZ, M.L. A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. **Food Microbiology**, v.7, p.237-240, 1990.

BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C. & DAMERT, W.C. When is simple good enough a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v.14, p.313-326, 1997.

BURDA, K. Incidence of patulina in apple, pear and mixed fruit products marketes in New South Wales. Apud SILIHA, H.; ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food-II. Technological and Analytical Aspects. **Fruit Processing**, v.5, p.164-167, 1999.

CAYRÉ, M.E., VIGNOLO, G. & GARRO, O. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. **Food Microbiology**, v.20, p.561-566, 2003.

CHEROUTRE-VIALETE, M.; LEBERT, I.; HEBRAUD, M.; LABADIE, J.C. & LEBERT, A. Effects of pH or a_w stress on growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.71-77. 1998.

CHORIN, E.; THUAULT, D.; CLERET, J. & BOURGEOIS, C. Modeling *Bacillus cereus* growth. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p.229-234, 1997.

CONNER, D.E. & BEUCHAT, L.R. Heat resistance of ascospores de *Neosartorya fischeri* as affected by sporulation and heating medium. **International Journal of Food Microbiology**, v.4, p.303-312, 1987.

CONSUMIDOR MODERNO. Cresce mercado de sucos prontos para beber. Agosto de 2002. <http://www.consumidormoderno.com.br>.

CORBO, M.R., ALTIERI, C., AMATO, D.D., CAMPANIELLO, D., NOBILE, M.A.D., SINIGAGLIA, M. Effect of temperature on shelf life and microbial population of lightly processed cactus pear fruit. **Postharvest Biol. Technol.**, v.31, p.93-104, 2004.

CUNHA, V.A.B. Estudo experimental e modelagem do crescimento de fungos filamentosos termorresistentes em sucos tropicais. Florianópolis, 134p, 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina.

CUPPERS, H.G.A.M.; OOMES, S. & BRUL, S. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.10, 1997.

DALGAARD, P. & KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, v.43, p.183-196, 2001.

DAVEY, K.R. Review Paper. Modeling the combined effect of temperature an pH on the rate coefficient for bacterial growth. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.295-303, 1994.

DAVEY, K.R., A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. **J. Appl. Bacteriol.**, v.67, p.483-488, 1989.

DAVEY, K.R. & DAUGHTRY, B.J. Validation of a model for predicting the combined effect of three environmental factors on both exponential and lag phases of bacterial growth: temp., salt concentration and pH. **Food Research International**, v.28, n.3, p.233-237, 1995.

DELGADO, D.A. Ação do peróxido de hidrogênio sobre bolores isolados de laminado para embalagens assépticas. Campinas, 2001. 221p. Dissertação de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

ENGEL, G. & TEUBER, M. Heat resistance of *Byssochlamys nivea* in milk and cream. **International Journal of Food Microbiology**, v.12, p.225-234, 1991.

ENIGL, D.C.; KING, J.R. & TÖRÖK, T. *Talaromyces trachyspermus*, a heat-resistant mold isolated from fruit juice. **Journal of Food Protection**, v.56, n.12, p.1039-1042, 1993.

ERKMEN, O. Mathematical modeling of *Escherichia coli* inactivation under high-pressure carbon dioxide. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.1, p.39-43, 2001.

ERKMEN, O. Predictive Modelling of *Listeria monocytogenes* Inactivation Under High Pressure Carbon Dioxide. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.33, n.7, p.514-519, 2000.

ERKMEN, O. & ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, v.52, p.161-166, 2002.

ESTADO DE MINAS. Lucro Líquido em Expansão. 17 de dezembro de 2006.

FRISVAD, J.C. & SAMSON, R.A. Filamentous fungi in foods and feeds: Ecology, Spoilage and Micotoxin production. In: ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G. & MARTH, E.H. (Eds) **Handbook of Applied Mycology-Foods and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., v.3, n.2, p.31-68, 1991.

FUJIKAWA, H., KAI, A., MOROZUMI, S. A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures. **Food Microbiology**, v.21, p.501-509, 2004.

GANZLE, M.G., EHMAN, M., HAMMES, W.P. Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2616-2623, 1998.

GARTHRIGHT, W.E. The three-phase linear model of bacterial growth: a response. **Food Microbiology**, v.14, p.395-397, 1997.

GIANNUZZI, L., PINOTTI, A., ZARITZKY, N. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v.39, p.101-110, 1998.

GIBSON, A.M. & HOCKING, A.D. Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, p.353-358, 1997.

GIBSON, A.M., BARANYI, J., PITT, J.I., EYLES, M.J., ROBERTS, T.A. Predicting fungal growth: the effects of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.419-431, 1994.

GIBSON, A.M.; BRATCHELL, N. & ROBERTS, T.A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal of Applied Bacteriology**, v.62, p.479-490, 1987.

GOMEZ, M.M.; BUSTA, F.F. & PELUG, I.J. Effect of the post dry heat treatment temperature on the recovery of ascospores of *Neosartorya fischeri*. **Letters Applied Microbiology**, v.8, p.59-62, 1989.

GOTTLIEB, D. Germination of fungus spores, **Endeanour**, v.23, p.85, 1964. Apud TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

GRESSONI, I. APPCC – Base para sucos processados assepticamente. Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas.

HENK, G.A., CUPPERS, M., OOMES, S., BRUL, S. A model for the combined effects of temperature and salt concentration on growth rate of food spoilage molds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3764-3769, 1997.

HOCKING, A.D. & PITT, J.I. Food spoilage fungi. II. Heat Resistant Fungi. **Csiro Division of Food Research**, North Ryde, N.S.W., 2113, v.44, n.4, p.73-82, 1984.

HOIRE, Y. & YAMAZAKI, M. Productivity of tremorgenic mycotoxins, fumitremorgins A e B in *Aspergillus fumigatus* and allied species. **Nippon Kingakkai Kaiko**, v.22, p.113-119, 1981. Apud NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R. & FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

HUDSON, J.A., MOTT, S.J. Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. **Journal of Food Safety**, v.14, p.329-339, 1994.

HULL, R. Studies of *Byssoschlamys fulva* and control measures in processed fruits. **Applied Biology**, v.26, p.800-822, 1939.

INVESTINDO EM MINAS GERAIS. Oportunidades de Negócios. Março de 2007.
<http://www.indi.mg.gov.br/oportunidades/frut.html>.

JACXSENS, L., DEVLIEGHERE, F., RAGAERT, P., VANNESTE, E., DEBEVERE, J. Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh cut produce. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.263-280, 2003.

JAY, J.M. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 804p, 1992.

JASENKA, Z.; PIECKOVA, E. & SEPTIKOVA, J. Thermoresistant propagules of *Neosartorya fischeri*: Some ecologic considerations. **Journal of Food Protection**, v.54, n.8, p.582-584, 1991.

KAKIOMENOUR, N., KAKOURI, A., TASSOU, C.C., NYCHAS, G.J.E. Storage of shredded carrots with modified atmospheres: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v.36, p.466, 1995.

KAVANAGH, J.; LARCHET, N. & STUART, M. Occurrence of heat resistance specie of *Aspergillus* in canned strawberries. **Nature**, v.198, p.1322, 1963.

KILCAST, D. & SUBRAMANIAM, P. Introduction. In: Editor. The stability and shelf-life of food. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2000.

KOTZEKIDOU, P. Heat resistance of *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. **Journal of Food Science**, v.62, n.2, p.410-412/437, 1997.

KRIST, K. A.; ROSS, T. e MC, T. A. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.195-203, 1998.

LABUZA, T.P. & FU, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.309-323, 1993.

LANGVAD, F. A rapid and efficient method for growth measurement of filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v.37, p.97-100, 1999.

LEGGOTT, N.L. & SHEPHARD, G.S. Patulin in South African commercial apple products. **Food Control**, v.12, p.73-76, 2001.

LI, K.Y. & TORRES, J.A. Microbial growth estimation in liquid media exposed to temperature fluctuations. **Journal of Food Science**, v.58, p.644-648, 1993.

LÓPEZ-MALO, A.; ALZAMORA, S.M. & PALOU, E. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.99, p.119–128, 2005.

LOVETT, J. & PEELER, J.T. Effects of pH on the thermal destruction kinetics of patulin in aqueous solutions. **Journal of Food Science**, v.38, p.1094, 1973.

MASSON, Y., AINSWORTH, P., FULLER, D., BOZKURT, H., IBANOGLU, S. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**, v.54, p.125-131, 2002.

MAUNDER, D.T. Summary of work on spoilage problems caused by molds of the *Byssoschlamys-Paecilomyces* group, in *Byssoschlamys* Seminar Abstract, Res. Circ. v.20, p.12-16, 1969. Apud TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

McCLURE, P.J., BLACKBURN, C. de W., COLE, M.B., CURTIS, P.S., JONES, J.E., LEGAN, J.D., OGDEN, I.D., PECK, M.W., ROBERTS, T.A., SUTHERLAND, J.P., WALKER, S.J.

Review Paper. Modeling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.265-275, 1994.

McEVOY, I.J. & STUART, M.R. Temperature tolerance of *Aspergillus fischeri* var. *glaber* in canned strawberries. Irish Agric. Res., v.9, p.59, 1970. Apud TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

McKELLAR, R.C. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.179-186, 1997.

McMEEKIN, T.A. & ROSS, T. Predictive microbiology: providing a Knowledge-based framework or change management. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.133-153, 2002.

McMEEKIN, T.A., BROWN, J., KRIST, K., MILES, D., NEUMEYER, K., NICHOLS, D.S., OLLEY, J., PRESSER, K., RATKOWSKY, D.A., ROSS, T., SALTER, M., SOONTRANON, S. Quantitative microbiology: a basis for food safety. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n.4, p.541-549, 1997.

McMEEKIN, T.A., OLLEY, J.N., ROSS, T., RATKOWSKY, D.A. Predictive microbiology: Theory and Application. Research Studies Press, Taunton, UK. 340 pp, 1993.

McMEEKIN, T.A., ROSS, T., OLLEY, J. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p.13-32, 1992.

MEMBRÉ, J.M.; LEPORQ, B.; VIALETTE, M.; METTLER, E.; PERRIER, L.; THUAULT, D.; ZWIETERING, M. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.179-186, 2005.

MISAWA, M., NARA, T., NAKAYAMA, K. & KINOSHITA, S. Formation of terrein by *Aspergillus fischeri* Wehmer. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v.36, p.699-703, 1962. Apud NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R. & FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

MOLINA, M. & GIANNUZZI, L. Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. **Food Research International**, v.32, p.677-682, 1999.

MORITZ, D.E. Produção de Pigmento Monascus por *Monascus ruber* CCT3802 por Cultivo Submerso. Florianópolis, 2005. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina.

NIELSEN, P.V. Preservative and temperature effect on growth of three varieties of the heat resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1735, 1991.

NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R. & FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.197-207, 1989.

NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R. & FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

OBETA, J.A.N. & UGWUANYI, J.O. Shelf life study of some Nigerian fruit juices inoculated of *Neosartorya* sp. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.50, p.325-331, 1997.

OLLIVER, M. & RENDLE, T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssoschlamys fulva* and its effect on the tissues of processed fruit. **Journal of Society Chem. Ind.**, v.53, p.166,

1934. Apud BEUCHAT, L.R. & RICE, S.L. *Byssochlamys* spp. and their importance in processed fruits. **Advances in Food Research**, v.25, p.237-289, 1979.

PALOU, E., LOPEZ-MALO, A., BARBOSA-CANOVAS, G.V., WELTI-CHANES, J., DAVIDSON, P.M. & SWANSON, B.G. Effect of oscillatory high hydrostatic pressure treatments on *Byssochlamys nivea* ascospores suspended in fruit juices concentrates. **Letters in Applied Microbiology**, n.27, p.375-378, 1998.

PATTERSON, D.S.P., SHREEVE, B.J., ROBERTS, B.B. & McDONALD, S.M. Verruculogen produced by soil fungi in England and Wales. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.916-917, 1981.

PEARL, R. The growth of populations. **Q. Rev. Biol.**, II 4, 532-548, 1927.

PEÑA, W. FARIA, J.A. & MASSAGUER, P.R. Development of Predictive Model on the Growth of the Spoilage Mould, *Paecilomyces variotti* in Pineapple Juice. **Fruit Processing**, v.14, n.6, p.420-426, 2004.

PERERA, K.P.W.C., DAY, J.B., MANTLE, P.G. & RODRIGUES, L. Metabolism of verruculogena in rats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.503-508, 1982.

PERNI, S.; ANDREW, P.W.; SHAMA, G. Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. **Food Microbiology**, v.22, p.491-495, 2005.

PITT, J.I. & HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. Sidney: Academic Press, 1985, 413 p.

PIRT, S.J. Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell, Oxford, 247 p., 1975.

PREGNOLATTO, W. & PREGNOLATTO, N.P. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz – Métodos Químicos e Físicos para a análise de Alimentos. Instituto Adolfo Lutz, 3º ed. São Paulo (Brasil), 1985.

QUINTAVALLA, S. & SPOTTI, E. Heat resistance of *Talaromyces flavus*, *Neosartorya fischeri* and *Byssoschlamys nivea* isolated from fresh fruits. **Microbiologie Aliments Nutrition**, v.11, p.335-341, 1993.

RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E.R. & ETHIRAJ, S. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. **Food Microbiology**, v.17, p.269-275, 2000.

RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E.R. & ETHIRAJ, S. Thermal death rate of ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC 200957 in presence of organic acids and preservatives in fruits juice. **Journal of Food Protection**, v.61, n.10, p.1358-1362, 1998.

RAJASHEKHARA, E.; SURESH, E.R. & ETHIRAJ, S. Influence of different heating media on thermal resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from papaya fruit. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.337-340, 1996.

RATKOWSKY, D.A., LOWRY, R.K., McMEEKIN, T.A., STOKES, A.N. & CHANDLER, R.E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, v.154, p.1222-1226, 1983.

RATKOWSKY, D.A., OLLEY, J., McMEEKIN, T.A., BALL, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v.149, p.1-5, 1982.

RICE, S.L.; BEUCHAT, L.R. & HEATON, E.K. Changes in the composition and texture of canned peach halves infected with *Byssoschlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.42, p.1562-1565, 1977.

ROSS, T. Predictive Microbiology for the Meat Industry. Meat and Livestock Australia, North Sydney, 196 p., 1999.

ROSS, T. & McMEEKIN, T.A. Review Paper. Predictive microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.241-264, 1994.

ROSSO, L., LOBRY, J.R., BAJARD, S., FLANDROIS, J.P. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.2, p.610-616, 1995.

SALOMÃO, B.C.M. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. Florianópolis, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina.

SAMAPUNDO, S., DEVLIEGHERE, F., De MEULENAER, B., GEERAERD, A.H., VAN IMPE, J.F., DEBEVERE, J.M. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.35-52, 2005.

SAMSON, R.A. & VAN REENEN-HOEKSTRA, E.S. Introduction to food-bom fungi. Netherlands: Central Bureal voor Schimmelcultures, 1988.

SAVITCI, L.A. GASPARINO FILHO, J.; MORETTI, V.A. Perfil industrial e de mercado para suco de abacaxi. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.25, n.2, p.153-168, 1995.

SCHAFFNER, D.W. & LABUZA, T.P. Predictive microbiology: where are we and where are we going? In: Overview-Outstanding symposia in food science & technology. **Food Technology**, v.51, n.4, p.95-99, 1997.

SCOTT, P.M. & SOMERS, E. Stability of patulin and penicilic acid in fruit juice and flour. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.16, p.483, 1968.

SHIMONI, E. e LABUZA, T. P. Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.394-402, 2000.

SILVA, A. R. Modelagem do crescimento de *Aspergillus niger* em néctar de manga, frente a pH e T. Campinas, 2006. 232p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

SKINNER, G.E., LARKIN, J.W., RHODEHAMEL, E.J. Mathematical modeling of microbial growth: A review. **Journal of Food Safety**, v.16, p.175-217, 1994.

SLONGO, A.P. Estudo da influência de diferentes fatores na termorresistência do fungo *Neosartorya fischeri* em sucos tropicais. Florianópolis, 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina.

SLONGO, A.P. & ARAGÃO, G.M.F. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.266-270, 2006.

SOBOLEVA, T.K.; PLEASANTS, A.B.; LE ROUX, G. Predictive microbiology and food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.183-192, 2000.

SPLITTSTOESSER, D.F. Fungi of importance in processed fruits. In ARORA, D.K.; MUKERJI, K.G. & MARTH, E.H. (Eds) **Handbook of Applied Mycology-Foods and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., v.3, n.7, p.201-219, 1991.

SPLITTSTOESSER, D.F. & SPLITTSTOESSER, C.M. Ascospores of *Byssoschlamys* compared with those of heat resistant *Aspergillus*. **Journal of Food Science**, v.42, n.3, p.685-688, 1977.

SPLITTSTOESSER, D.F.; NIELSEN, P.V. & CHUREY, J.J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya*. **Journal of Food Protection**, v.56, p.599-603, 1993.

SPLITTSTOESSER, D.F.; WILKISON, M. & HARRISON, V. Heat activation of *Byssoschlamys fulva* ascospores. **Milk Food Technology**, v.35, n.7, p.399-401, 1972.

SPLITTSTOESSER, D.F.; KUSS, F.R. & HARRISON, W. Enumeration of *Byssochlamys* and other heat-resistant molds. **Applied Microbiology**, v.20, p.393-397, 1970.

SPLITTSTOESSER, D.F.; CADWELL, M.C. & MARTIN, M. Ascospore production by *Byssochlamys fulva*. **Journal of Food Science**, v.34, p.248-250, 1969.

STRINGER, M. e DENNIS, C. Chilled foods. In: Editor Chilled foods. Cambridge, England: Woodhead Publishing Ltda, 2000.

SURESH, E.R.; S. ETHIRAJ & JAYARAM. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* isolated from grapes. **Journal of Food Science Technology**, v.33, n.1, p.76-77, 1996.

SWINNEN, I.A.M.; BERNAERTS, K.; DENS, E.J.J.; GEERAERD, A.H.; VAN IMPE, J.F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.137-159, 2004.

SYDENHAM, E.W.; VISMER, H.F.; MARASAS, W.F.; BROWN, N.L.; SCHLECTER, M. & RHEEDER, J.P. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. **Food Addit. Contam.**, v.45, n.5, p.429-434, 1997. Apud SILIHA, H. & ASKAR, A. Patulin in apple juice and children's apple food-II. Technological and Analytical Aspects. **Fruit Processing**, v.5, p.164-167, 1999.

TANIWAKI, M.H.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I., FLEET, G.H. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p.125-133, 2001.

TOURNAS, V. Heat Resistant Fungi of importance to the food and beverage industry. **Critical Review Microbiology**, v.20, n.4, p.243-263, 1994.

TOURNAS, V. Growth characteristics, heat resistance and ascospore ultrastructure of *Neosartorya fischeri*, Ph D dissertation, University of Rhode Island, Kingston, 1989.

TOURNAS, V. & TRAXLER, R.W. Heat resistance of a *Neosartorya fischeri* strain isolated from pineapple juice frozen concentrate. **Journal of Food Protection**, v.57, n.9, p.814-816, 1994.

UGWUANYI, J.O. & OBETA, J.A.N. Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.1054-1059, 1999.

UGWUANYI, J.O. & OBETA, J.A.N. Incidence of heat fungi in Nsukka, Southern Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.157-164, 1991.

VADASZ, A.S., VADASZ, P., ABASHAR, M.E., GUPTHAR, A.S. Recovery of an oscillatory mode of batch yeast growth in water for a pure culture. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.219-234, 2001.

VALÍK, L. & PIECKOVÁ, E. Growth modeling of heat resistant fungi: the effect of water activity. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.11-17, 2001.

VALÍK, L., BARANYI, GORNER, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.141-146, 1999.

VAN DER RIET, W.B. & VAN DER WALT, W.H. Effect of ionizing radiation on ascospores of three strains of *Byssoschlamys fulva* in apple juice. **Journal of Food Protection**, v.48, n.12, p.1016-1018, 1985.

VAN DER SPUY, J.E., MATTHEE, F.N. & CRAFFORD, D.J.A. The heat resistance of moulds *Penicillium vermiculatum* dangeard and *Penicillium brefeldianum* dodge in apple juice. **Phytophylactica**, v.7, p.105-108, 1975.

VAN IMPE, J.F., NICOLAI, B.M., SCHELLEKENS, M., MARTENS, T., DE BAERDEMAEKER, J. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, p.227-249, 1995.

VAN IMPE, J.F., NICOLAI, B.M., MARTENS, T., BAERDEMAEKER, J. & VANDEWALLE, J. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2901-2909, 1992.

VERHULST, P.F. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. Corr. Math. et Phys. Publ. par A. Quetelet. T X, p.113–121, 1838.

VERSYCK, K. J.; BERNAERTS, K.; GEERAERD, A. H. et al. Introducing optimal experimental design in predictive modeling: A motivating example. **International Journal of Food Microbiology**, v.51, p.39-51, 1999.

VINDELOV, J. & ARNEBORG, N. Effects of temperature, water activity, and syrup film composition on the growth of *Wallemia sebi*: development and assessment of a model predicting growth lags in syrup agar and crystalline sugar. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1652-1657, 2002.

WHITING, R.C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p.467-494, 1995.

WHITING, R.C. & BUCHANAN, R.L. A classification of models for predictive microbiology. **Food Microbiology**, v.10, p.175, 1993.

WIJTZES, T.; VAN'T RIET, K.; VELD, J. H. A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.79-90, 1998.

WITJZES, T., DE WIT, J.C., HUIS IN'T VELD, J.H.J., VAN'T RIET, K., ZWIETERING, M.H. Modelling bacterial growth of *Lactobacillus curvatus* as a function of acidity and temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2533-2539, 1995.

YAMAZAKI, M., SUZUKI, S. & MIYAKI, K. Neurotoxic studies on fumitremorgin A, a tremorgenic mycotoxin, on mice. **Journal Pharmacobiodyn**, v.2, p.119-125, 1979. Apud NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R. & FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

YAMAZAKI, M., SUZUKI, S. & MIYAKI, K. Tremorgenic toxins from *Aspergillus fumigatus*. **Fres. Chem. Pharm. Bull.**, v.19, p.1739-1740, 1971. Apud NIELSEN, P.V.; BEUCHAT, L.R. & FRISVAD, J.C. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by temperature, light and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1504-1510, 1988.

YATES, A.R. The occurrence of *Byssochlamys* sp. Moulds in Ontario. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.7, n.2, p.148-150, 1974.

YATES, A.R., & MOONEY, D.B. Production of pectic enzymes by *Byssochlamys nivea*. **Journal Institute Canadian Technology and Aliment**, v.1, n.3, p.106-109, 1968.

YATES, A.R., SEAMAN, A. & WOODBINE, M. Growth of *Byssochlamys nivea* in various carbon dioxide atmospheres. **Canadian Journal of Microbiology**, v.13, p.1120-1123, 1967.

ZWIETERING, M.H., CUPPERS, H.G.A.M., DE WIT, J.C., VAN'T RIET, K. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.195-203, 1994a.

ZWIETERING, M.H., DE WIT, J.C., CUPPERS, H.G.A.M., VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.204-213, 1994b.

ZWIETERING, M.H., KOOS, J.T., HASENACK, B.E., WIT, J.C., VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.4, p.1094-1101, 1991.

ZWIETERING, M.H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F.M. & VAN'T RIET, K. Modeling of bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.1875-1881, 1990.

PUBLICAÇÕES

CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – OUTUBRO
2006

MODELAGEM PREDITIVA DE CRESCIMENTO DE *Byssochlamys nivea* E *Neosartorya fischeri* EM SUCO DE ABACAXI

Leal, Patrícia A.; Maranhão, Adriane; Aragão, Gláucia M.F.

Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos.

Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Cx. Postal 476, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

Nos últimos anos, ocorreu um aumento no volume e variedade de produtos a base de frutas no mercado. Os métodos mais frequentes de preservação para estes produtos são a pasteurização e os processos de ultra-alta temperatura (UHT), sendo pouco frequente o uso de conservantes químicos. O estudo de fungos termorresistentes é de suma importância, pois os mesmos têm sido frequentemente associados à deterioração destes sucos, devido às características que possuem de sobreviverem à temperatura de pasteurização. As espécies reportadas como deterioradoras de produtos a base de frutas são: *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Neosartorya fischeri*, *Talaromyces* sp. e *Eupenicillium* sp. Estes fungos, quando presentes, além de deteriorarem os alimentos e causarem perdas econômicas, podem produzir toxinas que são prejudiciais à saúde humana. A contaminação por eles ocorre na parte superior da embalagem de produtos enlatados ou cartonados, sejam eles polpas ou sucos de frutas, concentrados, ou preparados de frutas para comida de bebê. Os produtos mais comumente envolvidos são aqueles a base de morango, ameixa, maçã, uva, abacaxi, mamão papaia, maracujá e tomate. Neste contexto, a microbiologia preditiva se apresenta como uma ferramenta importante para avaliação do crescimento destes fungos em diferentes produtos; sendo possível saber o quanto poderão interferir na vida de prateleira dos mesmos. Esta avaliação pode ser feita através de modelos matemáticos que descrevem o comportamento dos microorganismos sob diferentes condições de temperatura, pH e atividade de água. Com o intuito de estudar o crescimento de fungos termorresistentes, o presente trabalho teve como objetivo modelar o crescimento de *Neosartorya fischeri* e *Byssochlamys nivea* em suco de abacaxi pela medida da variação do diâmetro da colônia com o tempo. O crescimento foi

observado em três temperaturas (22, 25 e 28°C), a cada doze horas e as curvas (diâmetro X tempo) foram ajustadas pelos modelos de Gompertz Modificado e Logístico, para obtenção dos parâmetros λ (duração da fase de adaptação), μ_{\max} (velocidade específica máxima de crescimento) e A (diâmetro máximo atingido pela colônia). Com os valores dos parâmetros obtidos para cada temperatura, foi feita uma modelagem secundária (Modelo da Raiz Quadrada) indicando como estes variam com a temperatura (λ X T, μ_{\max} X T e A X T). Como resultado para o *Neosartorya fischeri* pode-se citar que os valores de μ_{\max} passaram de 0,13 mm/h a 22°C para 0,54 mm/h a 28°C, mostrando que quanto mais alta a temperatura, maior a velocidade específica máxima de crescimento; e os valores de A passaram de 6,6 mm a 22°C para 20,1 mm a 28°C, mostrando que quanto maior a temperatura maior o diâmetro máximo atingido pela colônia. Já em relação a λ , os valores passaram de 212,2 h a 22°C para 107,4 h a 28°C, indicando que quanto mais alta a temperatura, um menor tempo de adaptação é necessário para o fungo iniciar o crescimento; ou seja, menor a vida de prateleira. Para o *Byssochlamys nivea*, ocorreu o mesmo comportamento, ao aumentar a temperatura, os valores de μ_{\max} aumentaram de 0,35 mm/h a 22°C para 0,74 mm/h a 28°C; entretanto o valor de λ diminuiu de 270,1 h a 22°C para 136,4 h a 28°C, uma vez que o fungo precisou de menos tempo para começar a se desenvolver. Estes dados são importantes para o estabelecimento da vida de prateleira de sucos sujeitos a este tipo de contaminação.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY MEETING - JULHO 2007**Modeling *Byssochlamys nivea* and *Neosartorya fischeri* growth in pineapple juice**

Author Block Patrícia A Leal, Adriane Maranhão, Federal Univ of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; Pilar R Massaguier, State Univ of Campinas, Campinas SP, Brazil; Gláucia M ARAGÃO, Federal Univ of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Abstract:

Byssochlamys nivea and *Neosartorya fischeri* are heat resistant molds usually related to pineapple juice spoilage. Ascospores of these molds can often survive to commercial pasteurization heat treatments usually applied to fruits and fruit products and may spoil such products by germination and subsequent growth under reduced oxygen conditions. The aim of this work was modeling the growth of these heat resistant fungi in pineapple juice at room temperatures to generate data to determine the shelf life of this product. *B. nivea* and *N. fischeri* growth was studied at 22, 25 and 28°C in pineapple juice. Polyethylene terephthalate (PET) transparent bottles with pineapple juice were inoculated with ascospores of each fungi (separately) and the colony diameter was measured during the time. Growth curves were generated by fitting the data of colony diameter (mm) with time (hours) and the growth parameters were obtained fitting the Modified Gompertz and Logistic models to the curves using non-linear regression. Statistics analyses were done to evaluate the models. The maximum specific growth rate (μ_{\max}), lag time (λ) and maximum colony diameter (A) were determined. For *Neosartorya fischeri*, μ_{\max} increase from 0.13 mm/h at 22°C to 0.54 mm/h at 28°C; A increase from 6.6 mm at 22°C to 20.1 mm at 28°C; and λ , decrease from 212.2 h at 22°C to 107.4 h at 28°C. For *B. nivea*, μ_{\max} increases from 0.35 mm/h at 22°C to 0.74mm/h at 28°C and λ , decrease from 270.1 h at 22°C to 136.4 h at 28°C. The results showed that when the temperature increases from 22 to 28 °C, μ_{\max} increase and the lag time (λ) decreases for both molds. The data obtained are useful for the establishment of the shelf life of ready to drink pineapple juice.

5TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PREDICTIVE MODELLING IN FOODS –
SETEMBRO 2007

Modeling growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya juice: effect of ascospores formation temperature, juice storage temperature, ratio and package head space

Patrícia Alves Leal, *Federal University of Santa Catarina*; **Pilar Rodriguez de Massaguer**, *State University of Campinas*; **Gláucia Falcão Aragão**, *Federal University of Santa Catarina*

Abstract

Neosartorya fischeri has been recognized as one of the most heat resistant mold present in fruit and fruit juices, able to survive pasteurization process, and to produce mycotoxins. This research aimed to study the growth of inoculated *Neosartorya fischeri* ascospores in pineapple and papaya juices, by measuring the colony diameter and to determine the effect of ascospore formation temperature (25–35°C), juice storage temperature (22–28°C), ratio (10–38 for pineapple and 26–66 for papaya juice) and head space percentage (8–28). Mold ascospores were produced in Roux bottle with Malt extract Agar (pH 5.4) incubated at 25, 30 and 35°C for 30 days and collected in sterile water, filtered to remove mycelium, washed and centrifuged twice at 4000 rpm, and stored at 4°C before use. After activation at 80°C for 30 min, suspension was counted by pour plating on PDA. Activated ascospores suspension was inoculated in 250 mL PET bottles filled with pasteurized juice. Growth was followed by microscopic observation of a colony in tilted bottle during juice storage, measuring the largest colony diameter. For primary growth modeling, Logistic and Modified Gompertz models were used for both juices. A 2⁴ fractional factorial screening design, two levels, 3 central points was selected to study the factors effects on: lag time λ (h), maximum specific growth rate μ_{\max} (mm/h), and maximum colony diameter A (mm). Four different replicates were followed in each experiment. The performance of the models was tested by correlation coefficient r^2 , MSE, bias factor and accuracy factor. Statistical analysis was done using Statistics version 6. ANOVA ($p < 0.05$) was used to calculated net effects.

Two replicates showing the shortest and the next shortest lag time were selected from each assay, representing the fastest occurrence of visual mold growth on the juice. There was no significant difference among the respective parameters λ , μ_{\max} e A ($p > 0.05$) calculated by the Logistic and the

Modified Gompertz model for an specific assay, but in most experiments Modified Gompertz model better represented the data than the Logistic model.

Largest λ (380 h) was observed for pineapple juice, when ascospores were formed at 35°C, and the juice stored at 22°C, with high ratio and low head space. On the other side, lowest lag time (74 h) occurred when spore were formed at 25°C and juice storage temperature was 28°C, with high ratio and low head space, however both conditions decrease shelf life.

For pineapple juice, spore formation temperature had a significant effect ($p < 0.05$) on λ , μ_{\max} and A. While storage temperature was also significant on λ and μ_{\max} , ratio was only significant on μ_{\max} . For papaya juice, ratio had a significant effect ($p < 0.05$) on μ_{\max} and A, while juice storage temperature influenced significantly only λ and A. Head space was not significant on the range studied for both juices. Finally the effect of mold growth conditions on growth parameters depends on the substrate, where the mold had grown.

ANEXO I

AJUSTE DOS MODELOS DE GOMPERTZ MODIFICADO E LOGÍSTICO
AOS DADOS EXPERIMENTAIS

I.A. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi

Ensaio 1: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 10 e Espaço livre da garrafa = 8%.

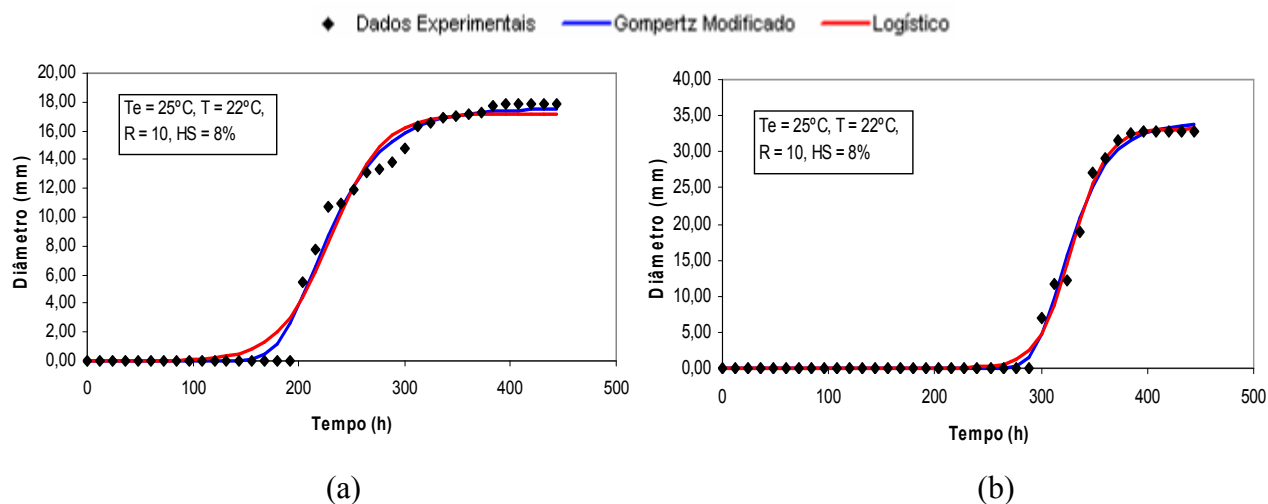


Figura A.1. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 2: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 10 e Espaço livre da garrafa = 28%.

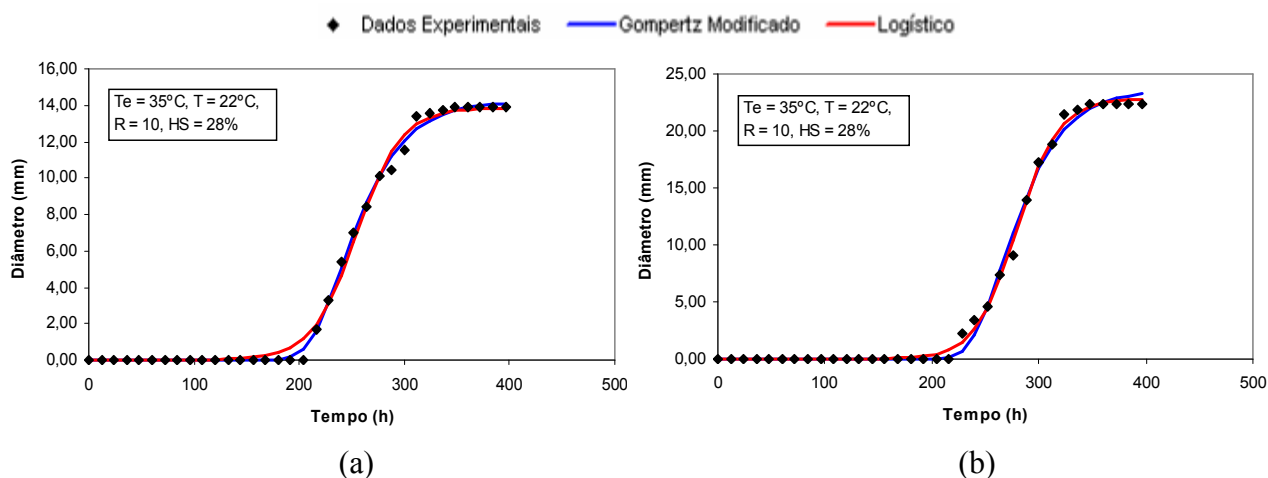


Figura A.2. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.

Ensaio 3: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 10 e Espaço livre da garrafa = 28%.

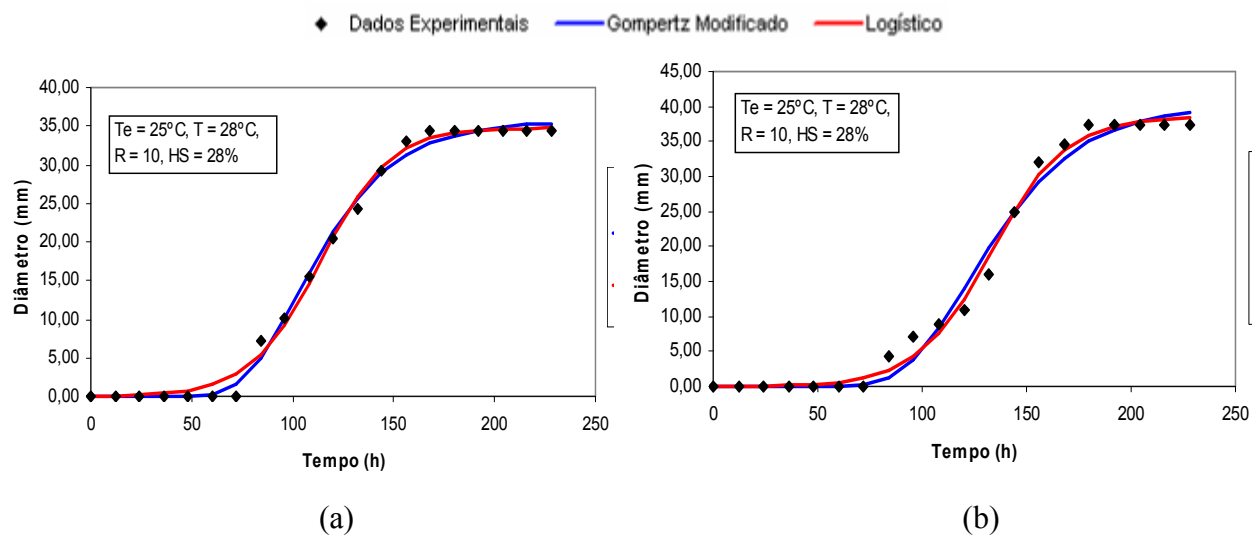


Figura A.3. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 4: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 10 e Espaço livre da garrafa = 8%.

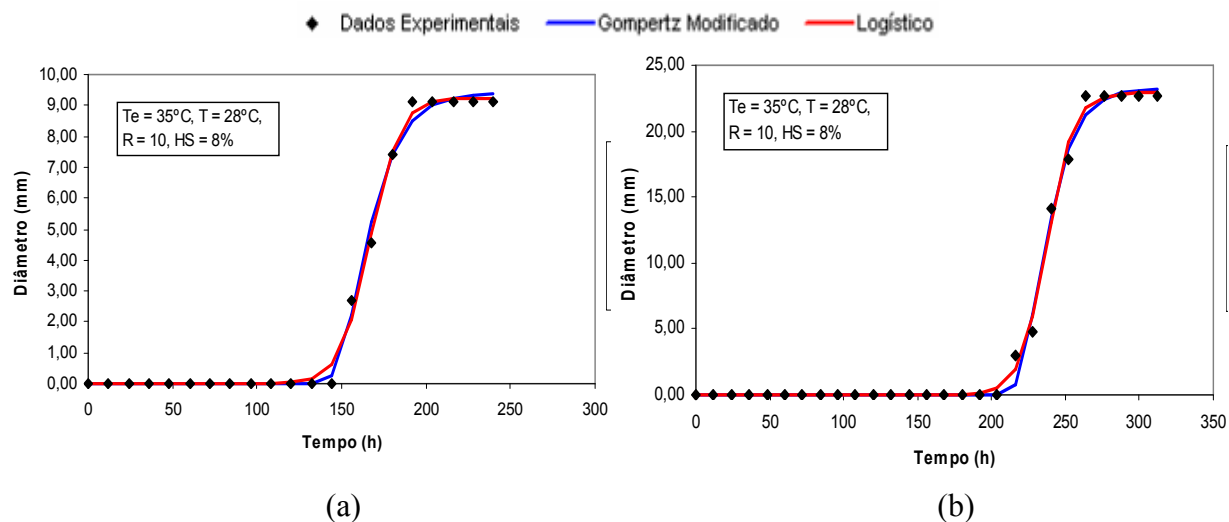


Figura A.4. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.

Ensaio 5: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 38 e Espaço livre da garrafa = 28%.

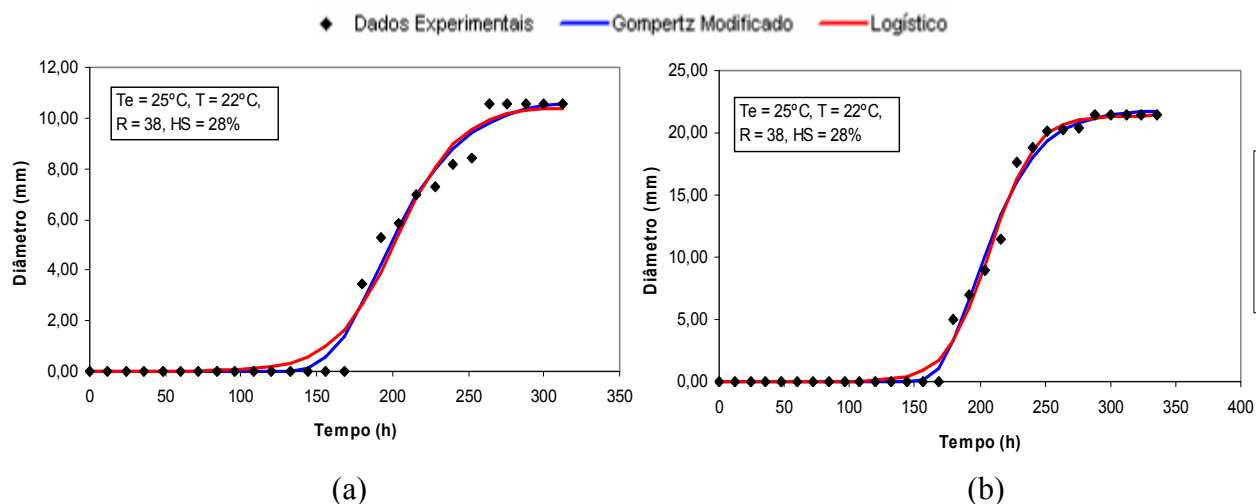


Figura A.5. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 4.

Ensaio 6: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 38 e Espaço livre da garrafa = 8%.

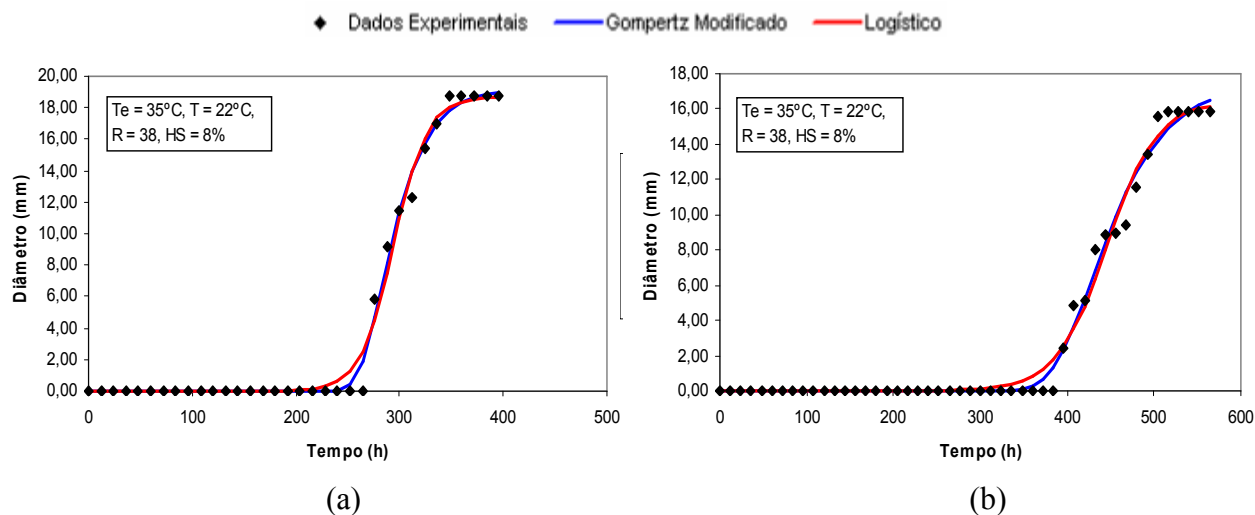


Figura A.6. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 7: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 38 e Espaço livre da garrafa = 8%.

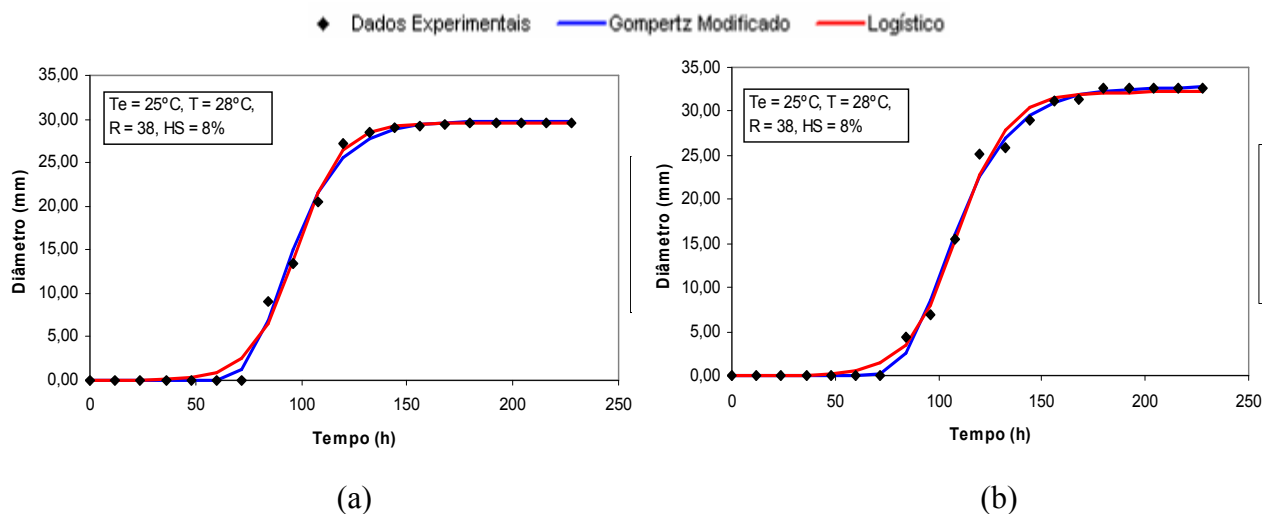


Figura A.7. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.

Ensaio 8: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 38 e Espaço livre da garrafa = 28%.

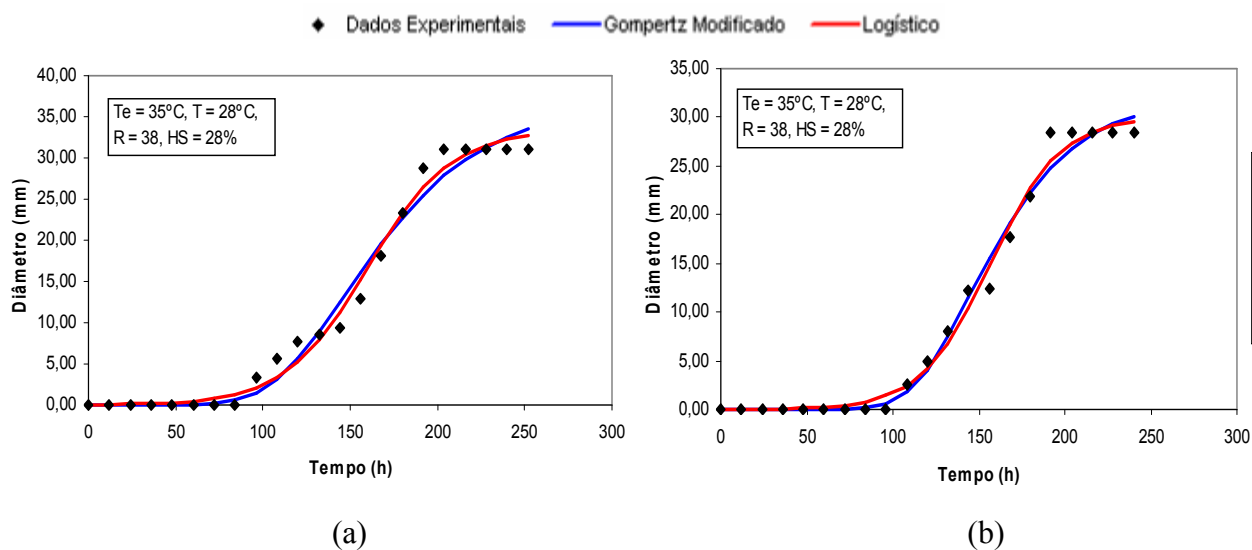


Figura A.8. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 9: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 24 e Espaço livre da garrafa = 18%.

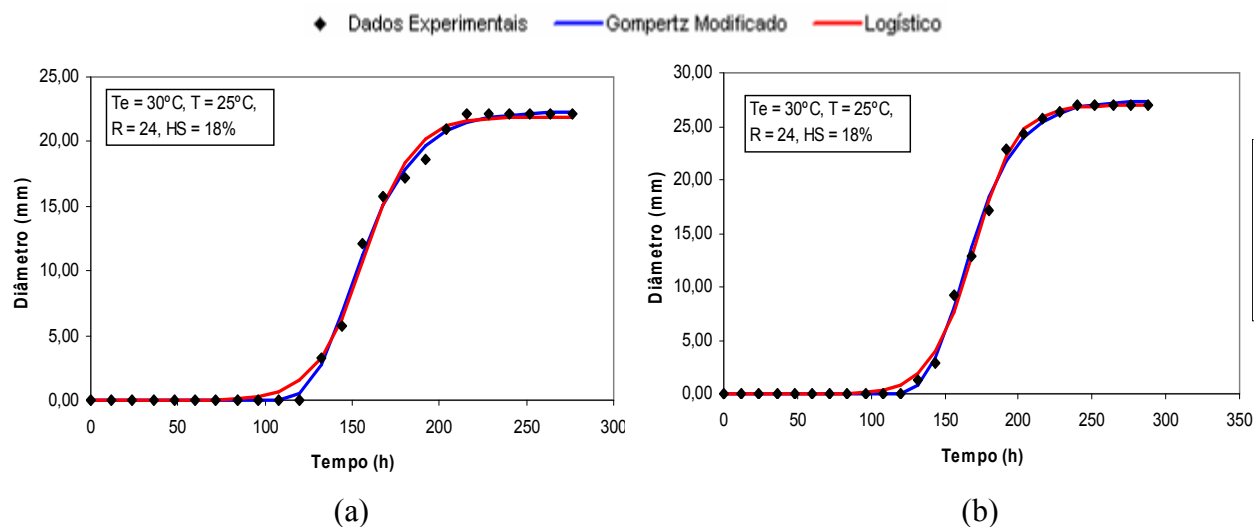


Figura A.9. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 4.

Ensaio 10: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 24 e Espaço livre da garrafa = 18%.

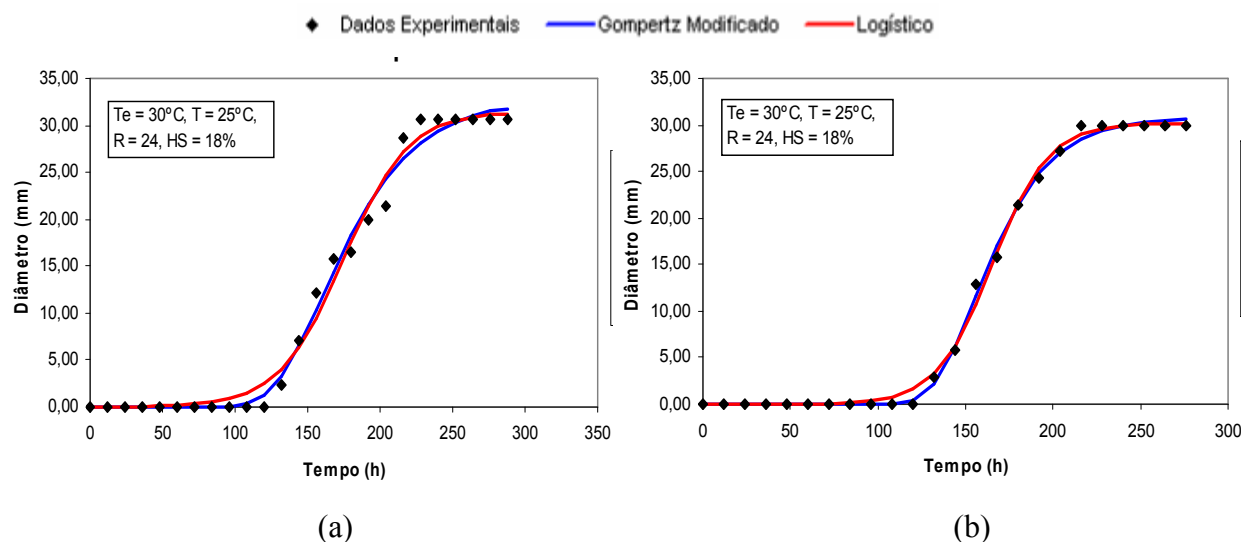


Figura A.10. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 11: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 24 e Espaço livre da garrafa = 18%.

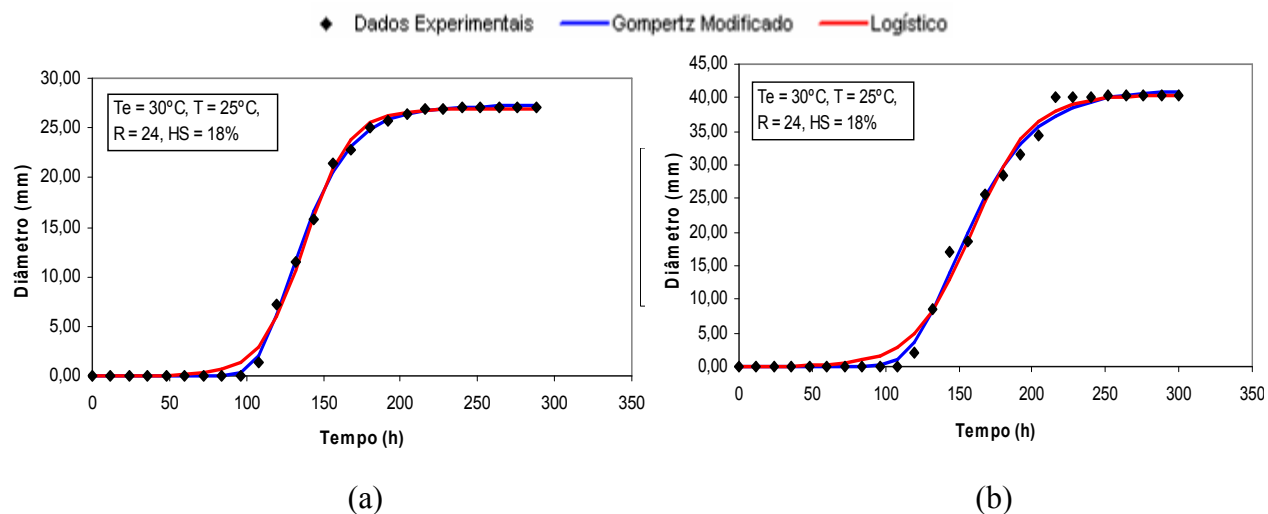


Figura A.11. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

I.B. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi

Ensaio 1: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 10 e Espaço livre da garrafa = 8%.

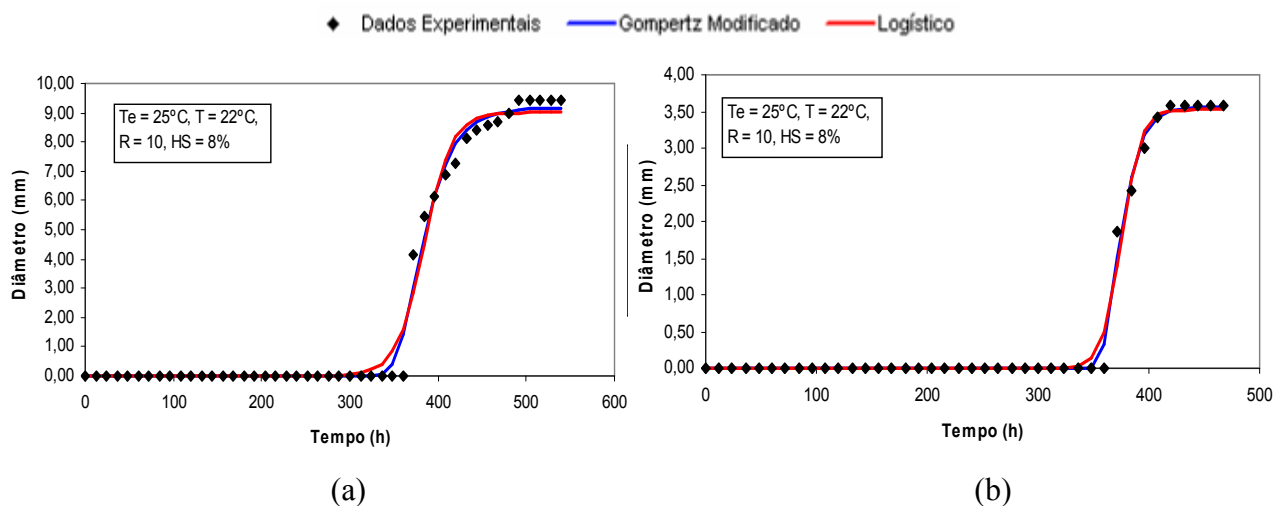


Figura A.12. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 1.

Ensaio 2: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 10 e Espaço livre da garrafa = 28%.

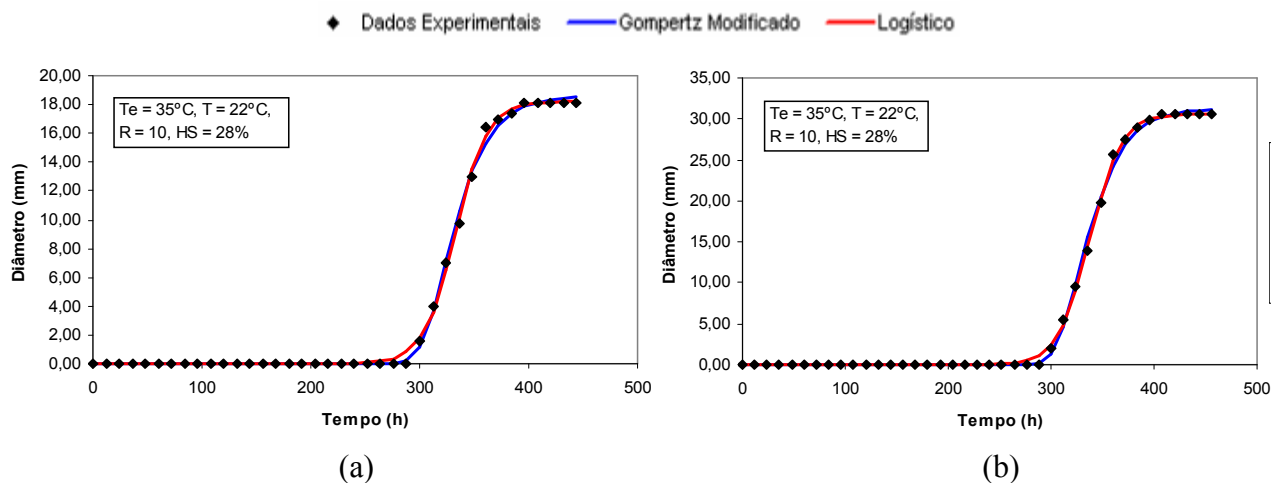


Figura A.13. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.

Ensaio 3: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 10 e Espaço livre da garrafa = 28%.

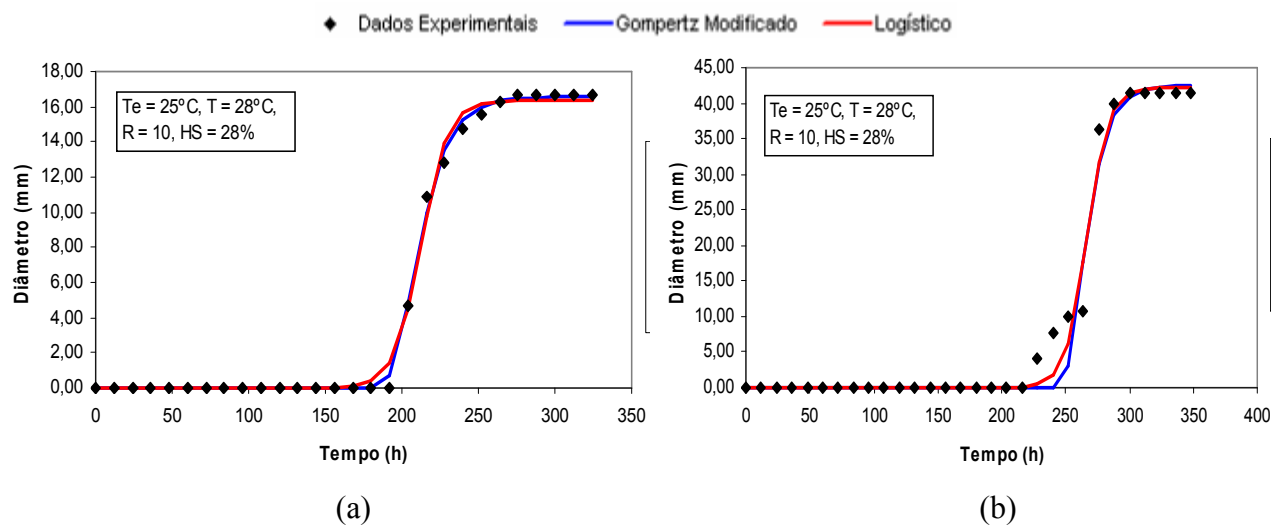


Figura A.14. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.

Ensaio 4: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 10 e Espaço livre da garrafa = 8%.

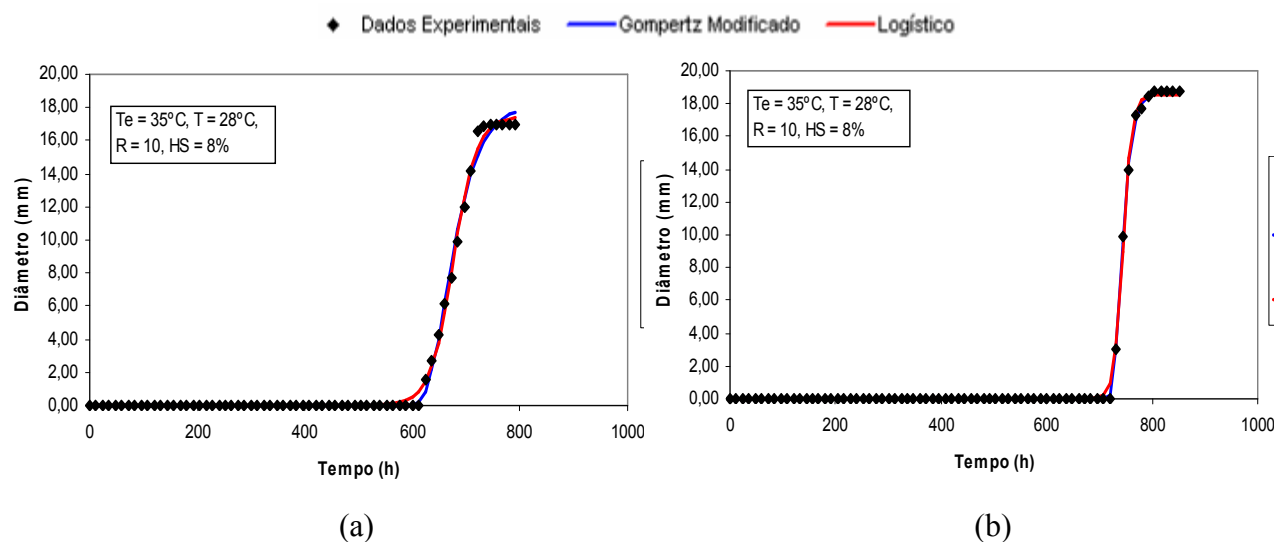


Figura A.15. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 5: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 38 e Espaço livre da garrafa = 28%.

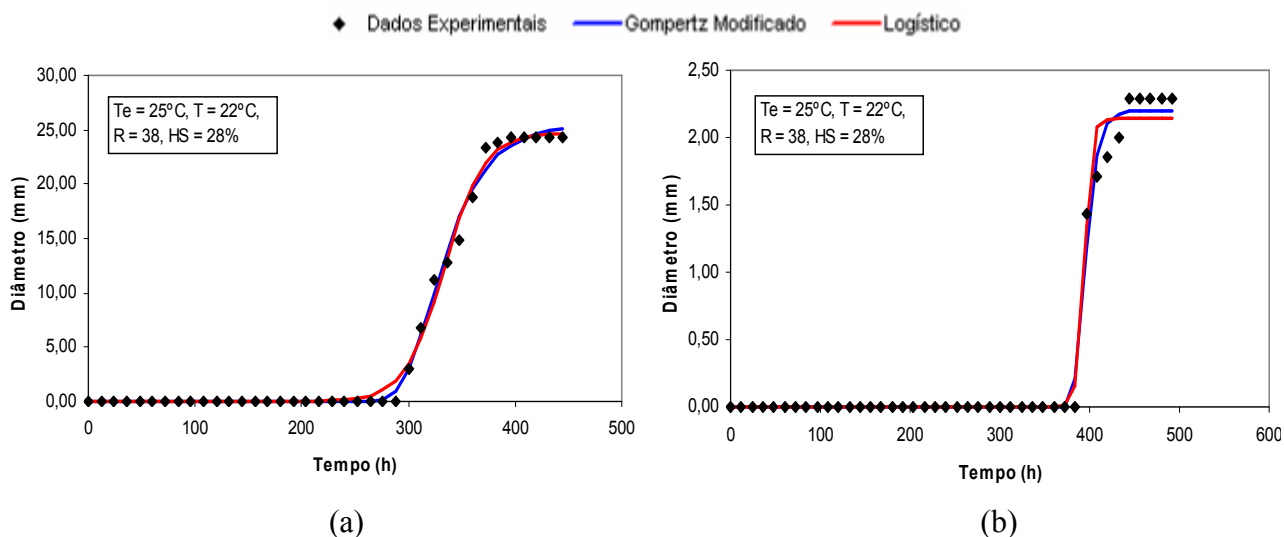


Figura A.16. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 6: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 38 e Espaço livre da garrafa = 8%.

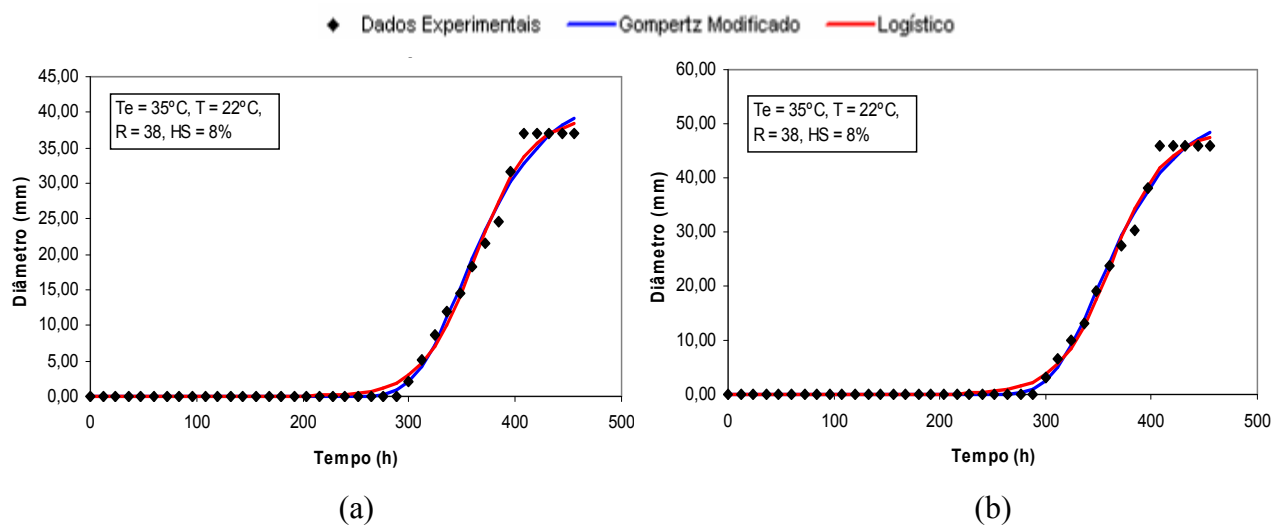


Figura A.17. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 3.

Ensaio 7: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 38 e Espaço livre da garrafa = 8%.

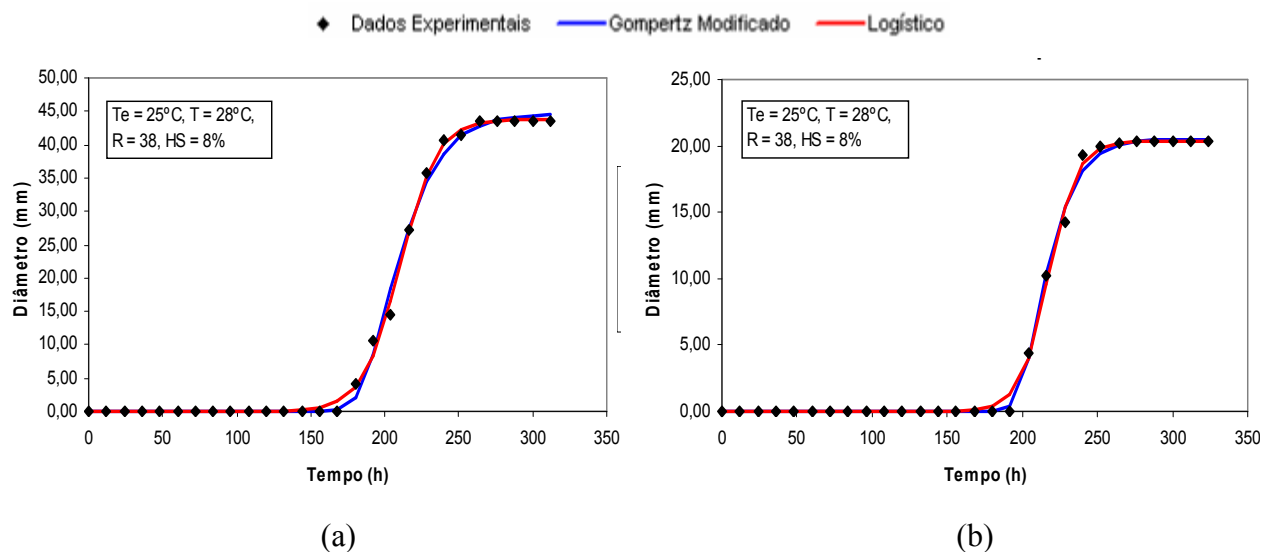


Figura A.18. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 4 e (b) Réplica 3.

Ensaio 8: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 38 e Espaço livre da garrafa = 28%.

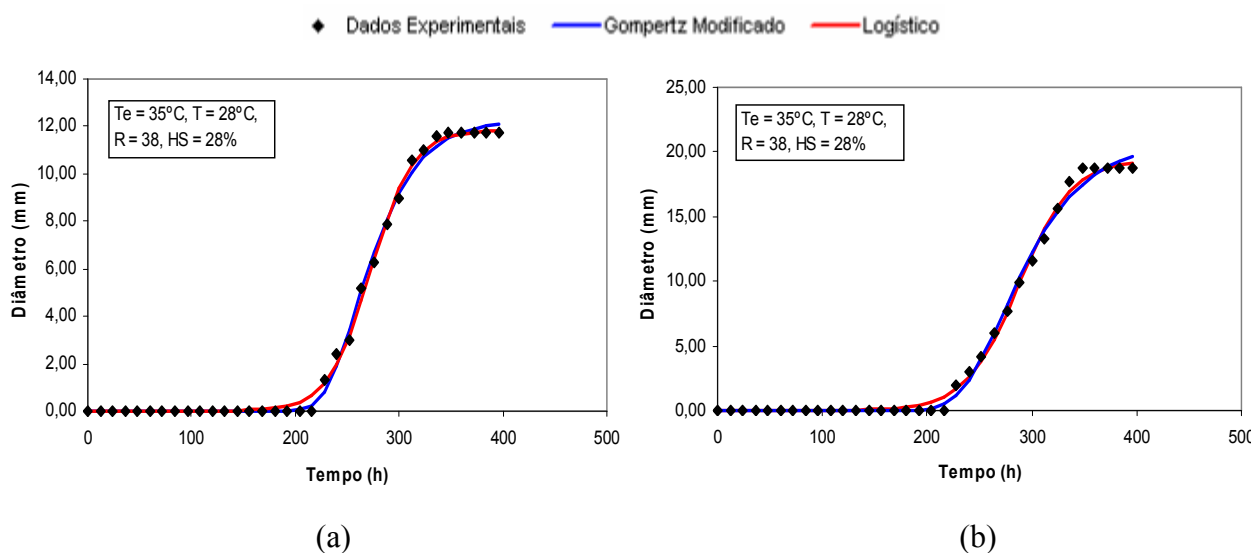


Figura A.19. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.

Ensaio 9: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 24 e Espaço livre da garrafa = 18%.

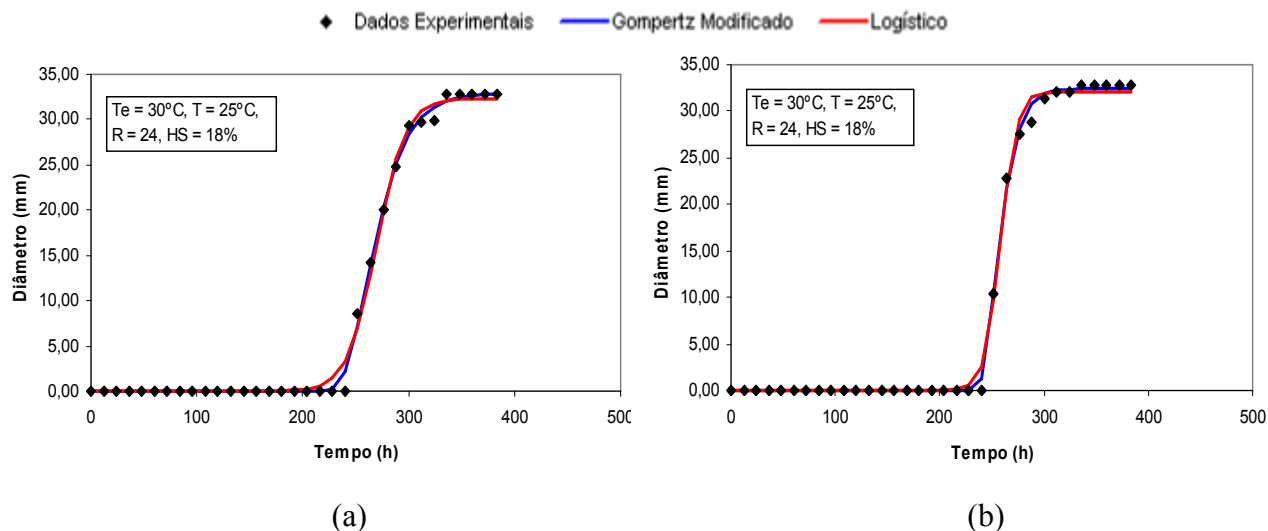


Figura A.20. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 1.

Ensaio 10: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 24 e Espaço livre da garrafa = 18%.

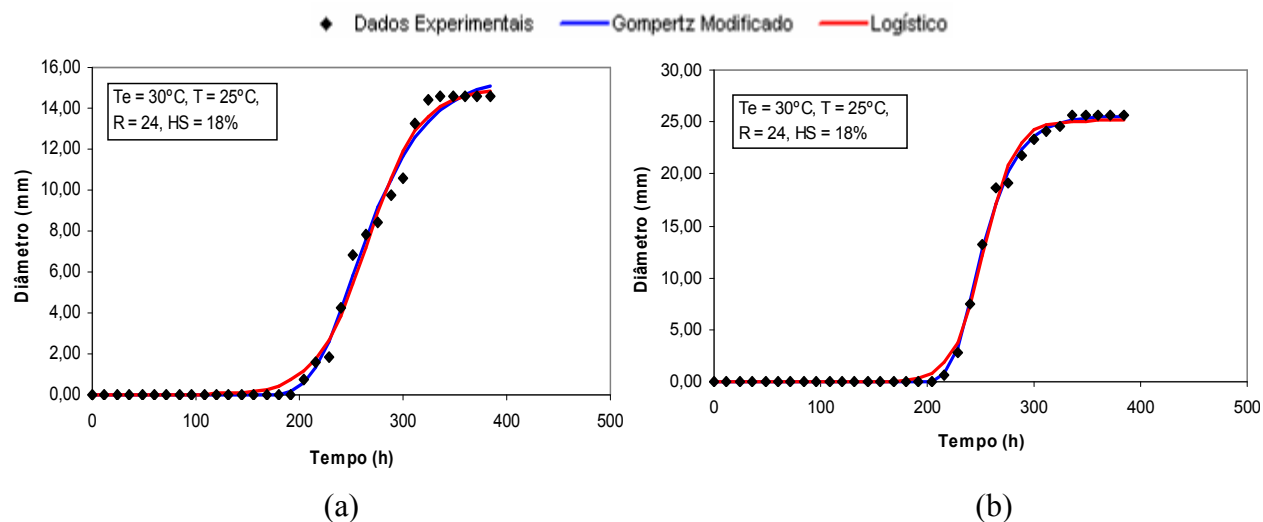


Figura A.21. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 4.

Ensaio 11: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 24 e Espaço livre da garrafa = 18%.

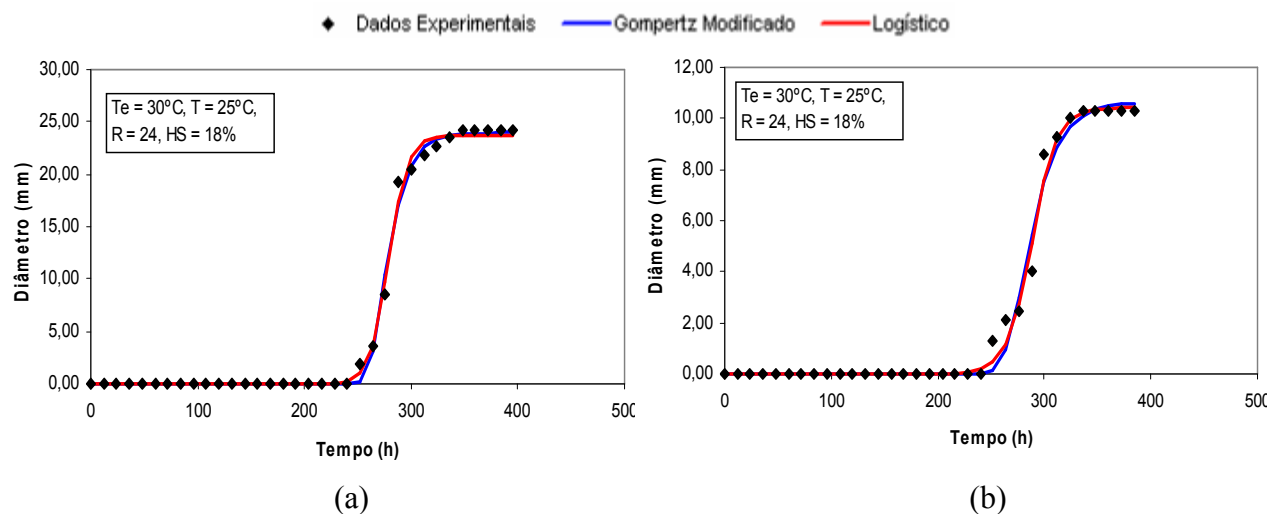


Figura A.22. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 4.

I.C. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão

Ensaio 1: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 26 e Espaço livre da garrafa = 8%.

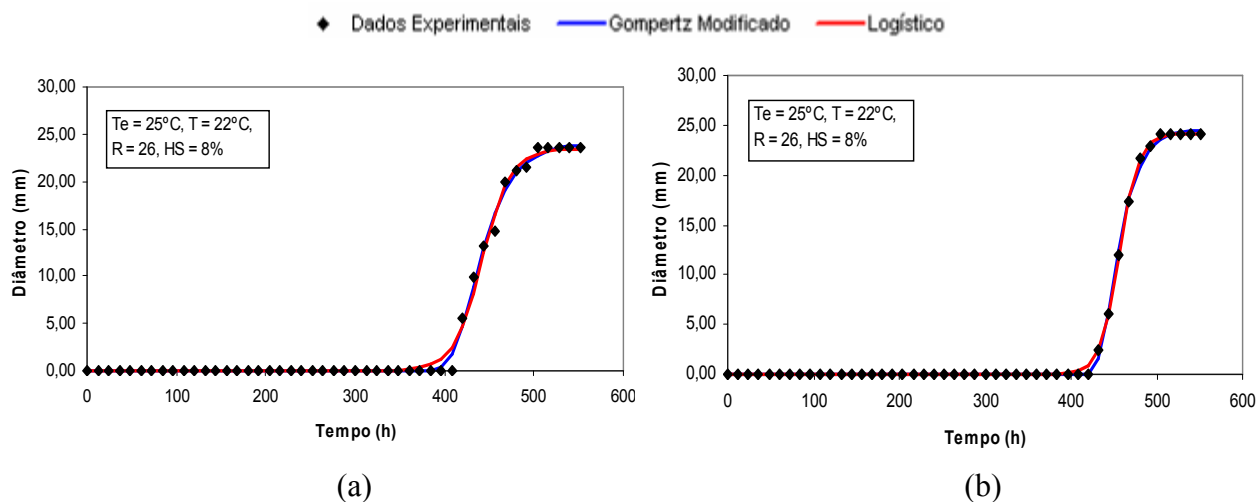


Figura A.23. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.

Ensaio 2: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 26 e Espaço livre da garrafa = 28%.

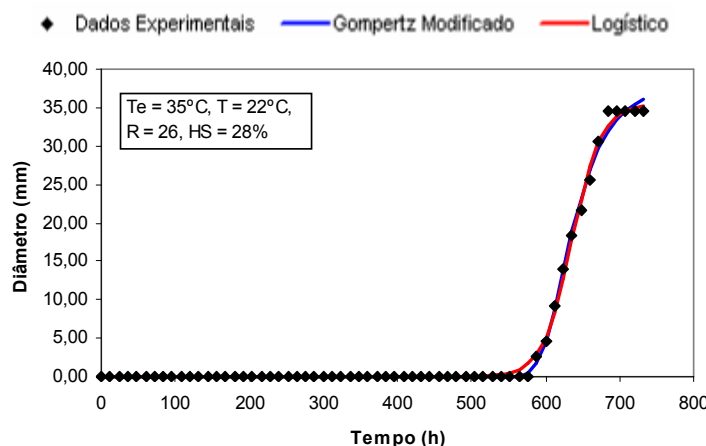


Figura A.24. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro (Réplica 3).

*Não houve crescimento nas outras réplicas.

Ensaio 3: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 26 e Espaço livre da garrafa = 28%.

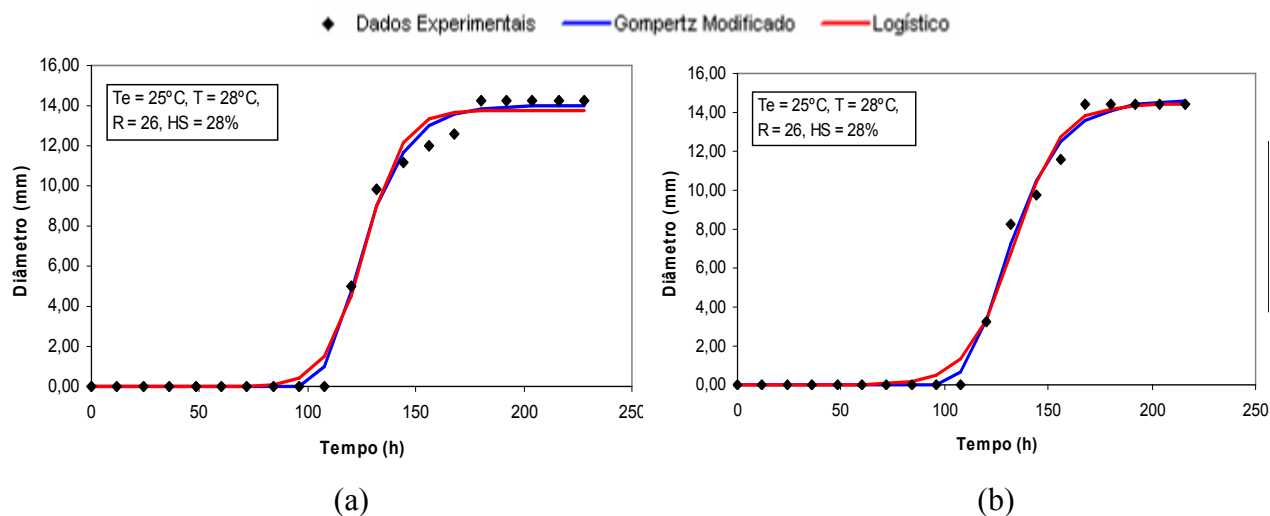


Figura A.25. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.

Ensaio 4: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 26 e Espaço livre da garrafa = 8%.

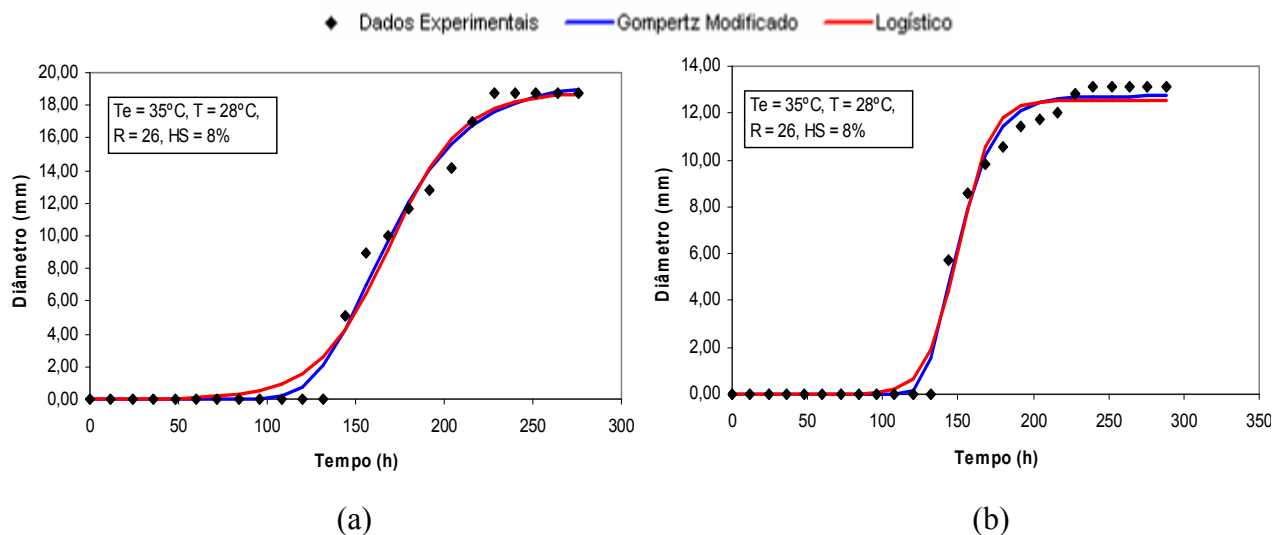


Figura A.26. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 5: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 66 e Espaço livre da garrafa = 28%.

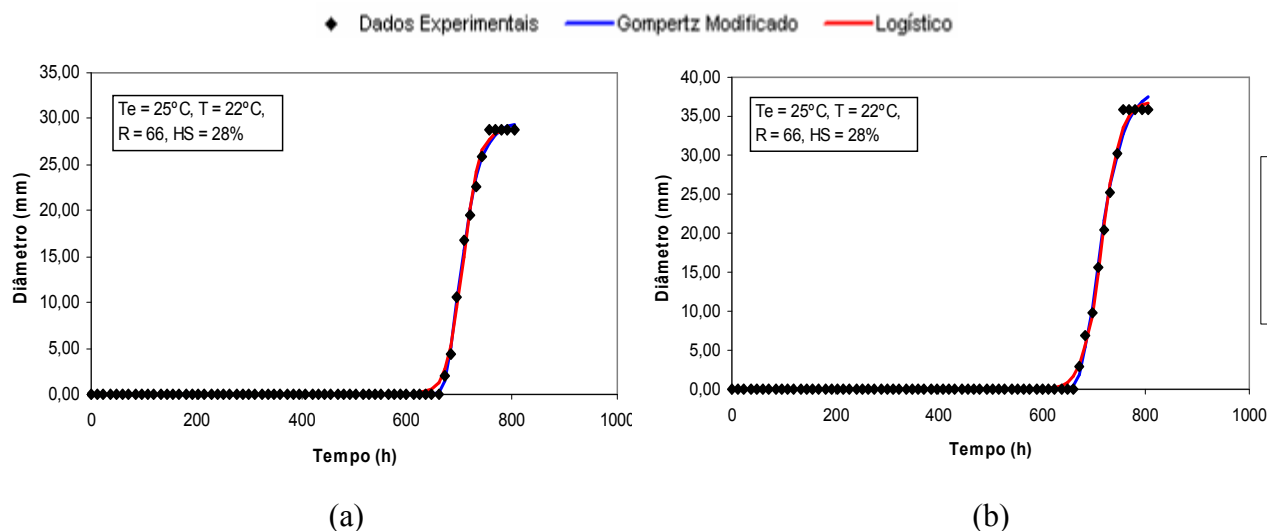


Figura A.27. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 6: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 66 e Espaço livre da garrafa = 8%.

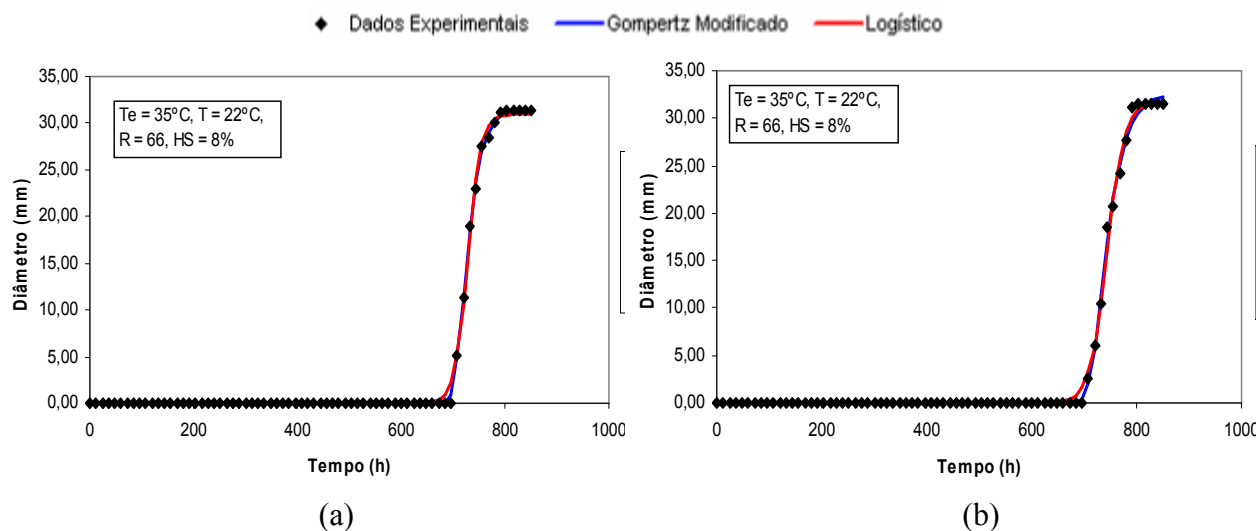


Figura A.28. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.

Ensaio 9: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 46 e Espaço livre da garrafa = 18%.

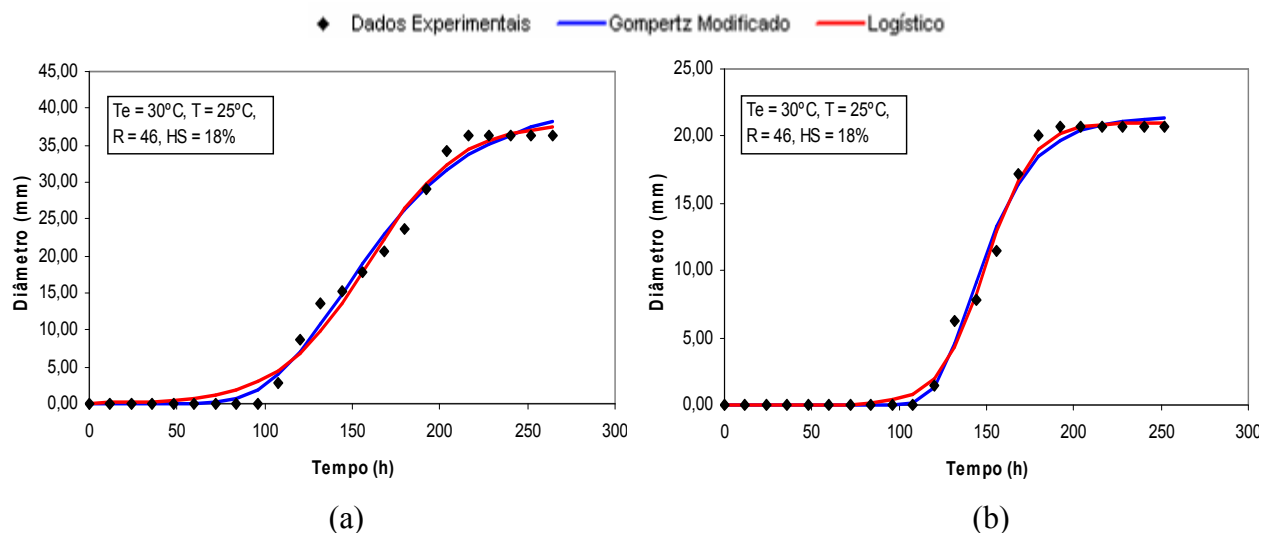


Figura A.31. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 10: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 46 e Espaço livre da garrafa = 18%.

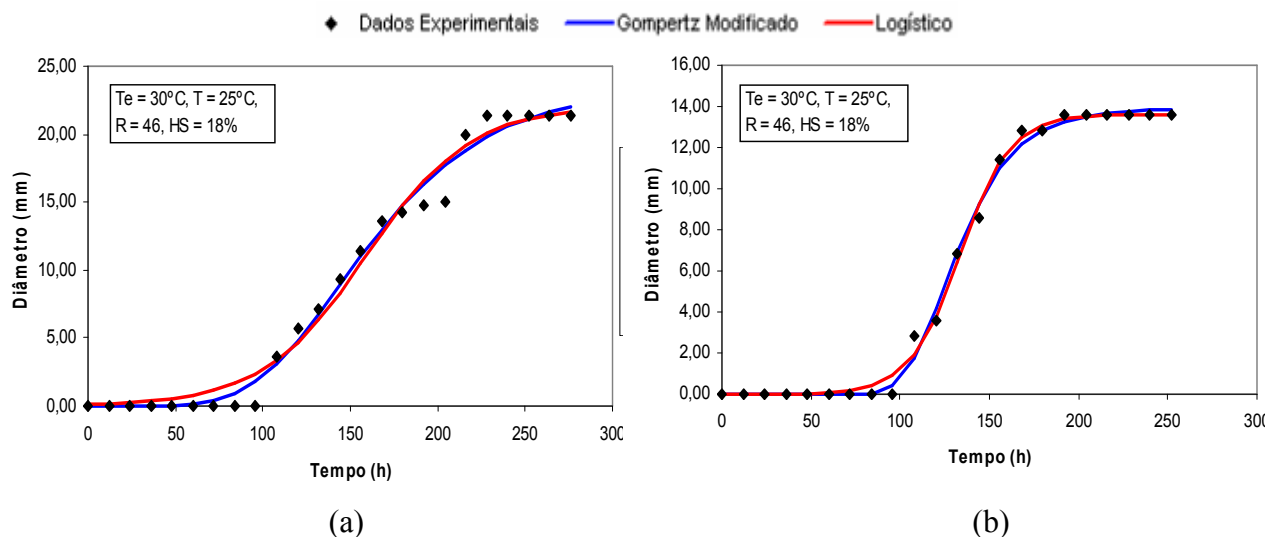


Figura A.32. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.

Ensaio 11: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 46 e Espaço livre da garrafa = 18%.

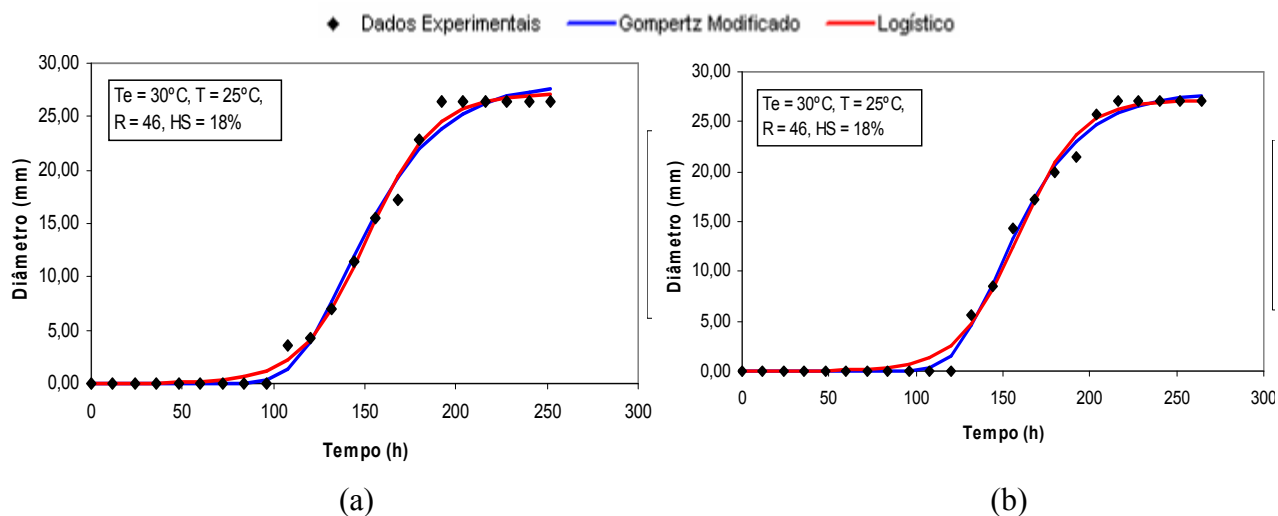


Figura A.33. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 4 e (b) Réplica 3.

I.D. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão

Ensaio 1: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 26 e Espaço livre da garrafa = 8%.

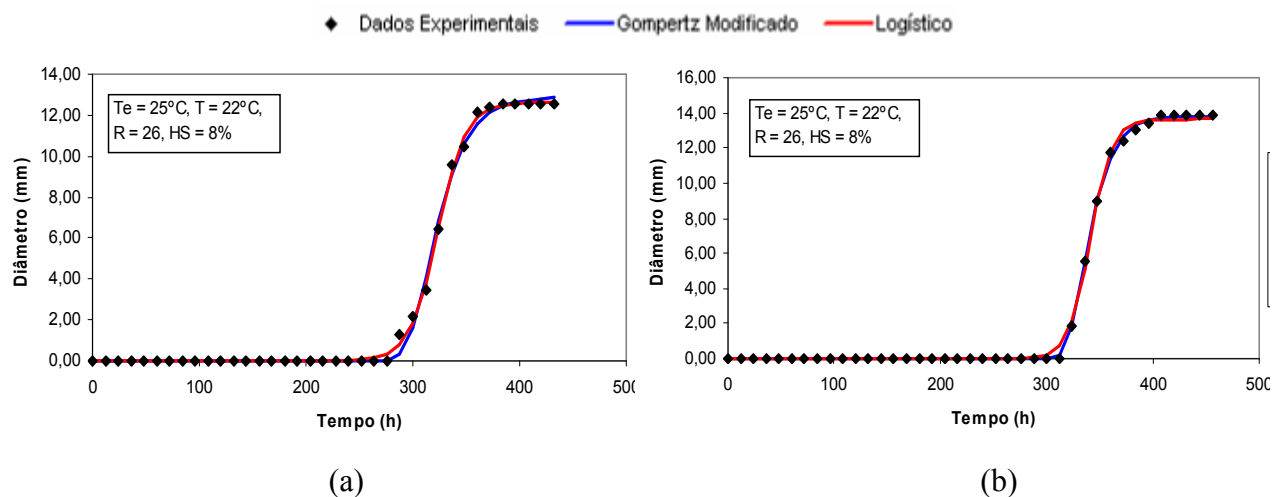


Figura A.34. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 2: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 26 e Espaço livre da garrafa = 28%.

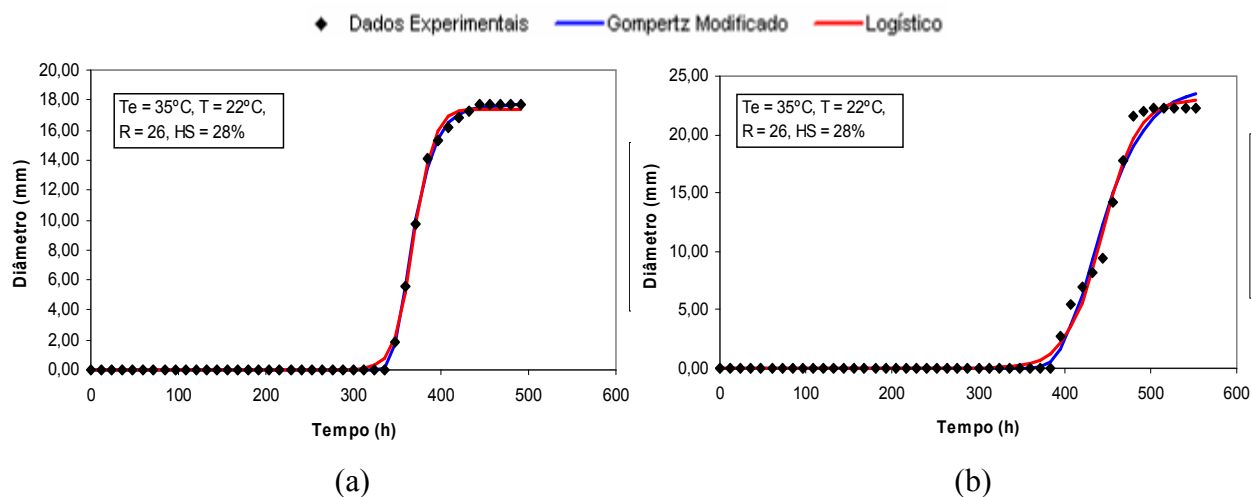


Figura A.35. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.

Ensaio 3: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 26 e Espaço livre da garrafa = 28%.

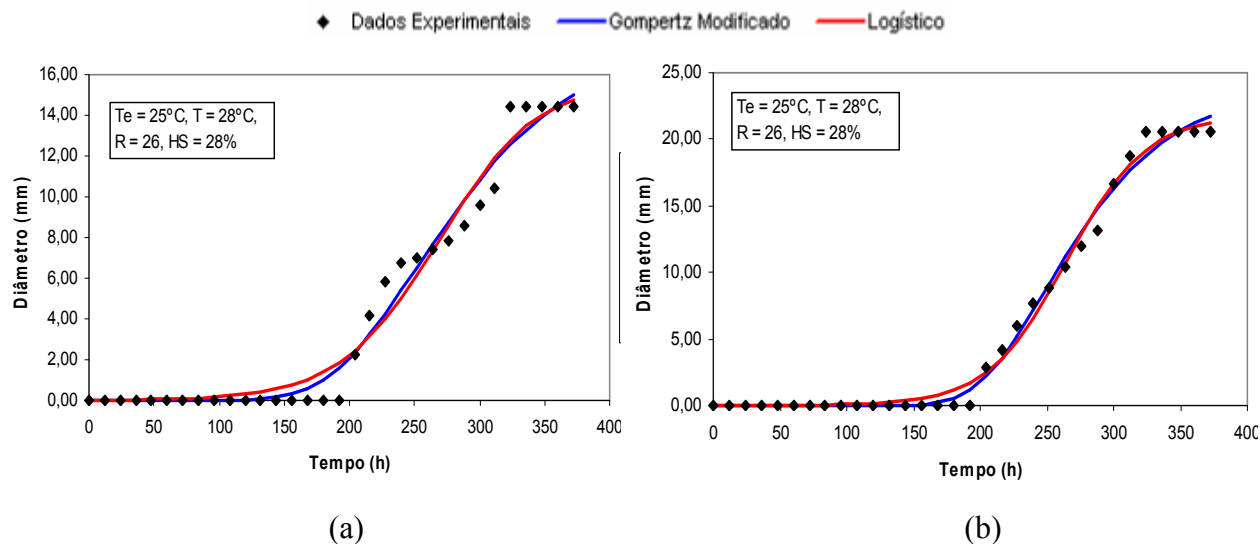


Figura A.36. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.

Ensaio 4: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 26 e Espaço livre da garrafa = 8%.

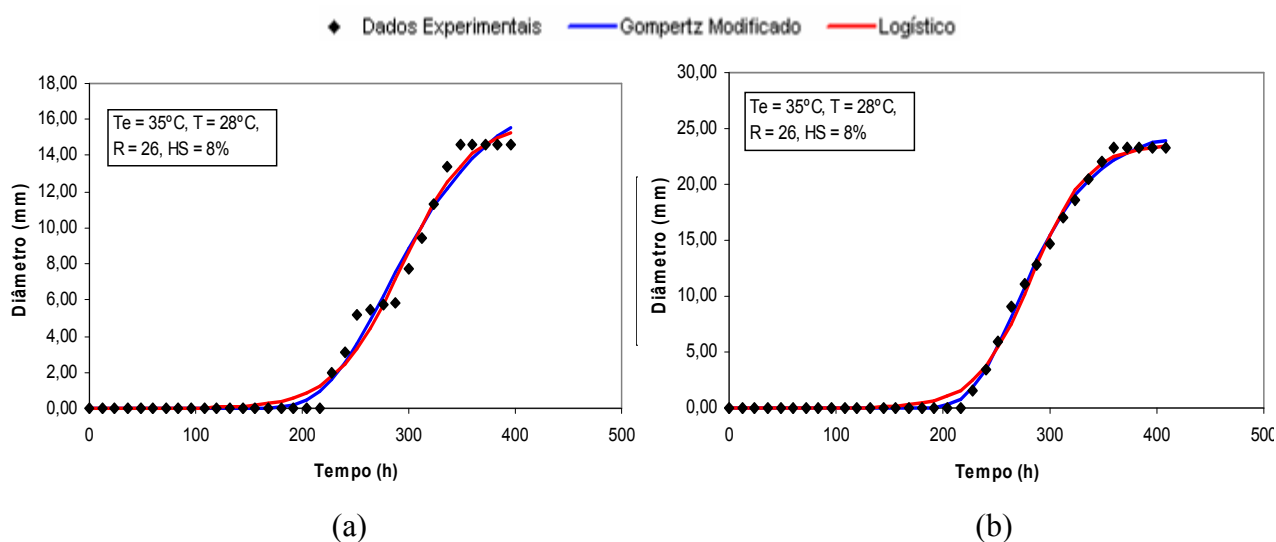


Figura A.37. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.

Ensaio 5: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 66 e Espaço livre da garrafa = 28%.

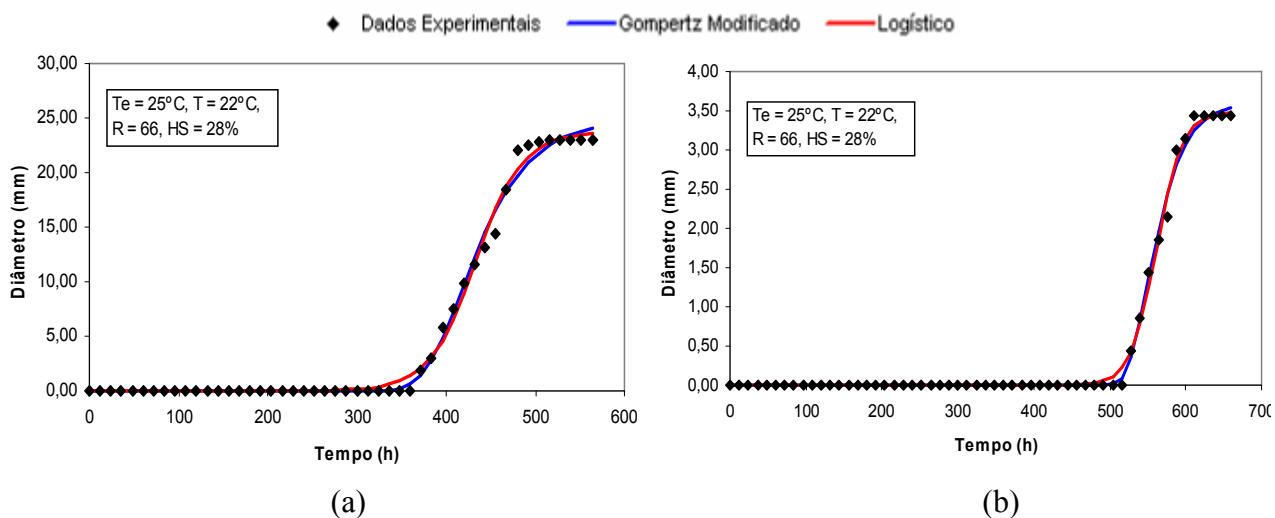


Figura A.38. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 3.

Ensaio 6: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 22°C, *Ratio* = 66 e Espaço livre da garrafa = 8%.

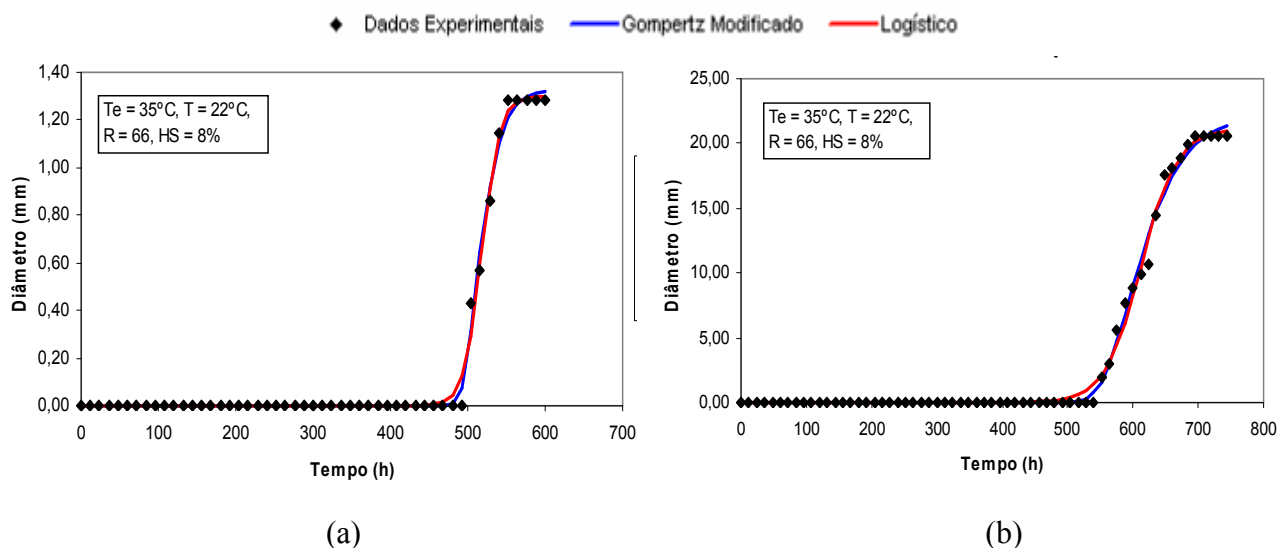


Figura A.39. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 1.

Ensaio 7: Temperatura de produção dos esporos = 25°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 66 e Espaço livre da garrafa = 8%.

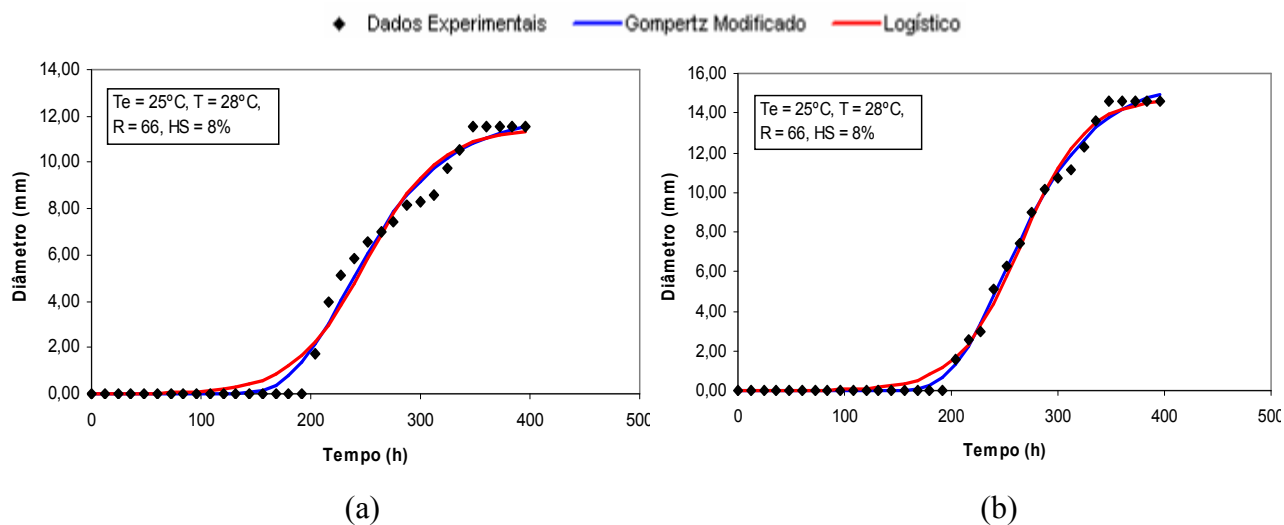


Figura A.40. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 2.

Ensaio 8: Temperatura de produção dos esporos = 35°C, Temperatura de crescimento = 28°C, *Ratio* = 66 e Espaço livre da garrafa = 28%.

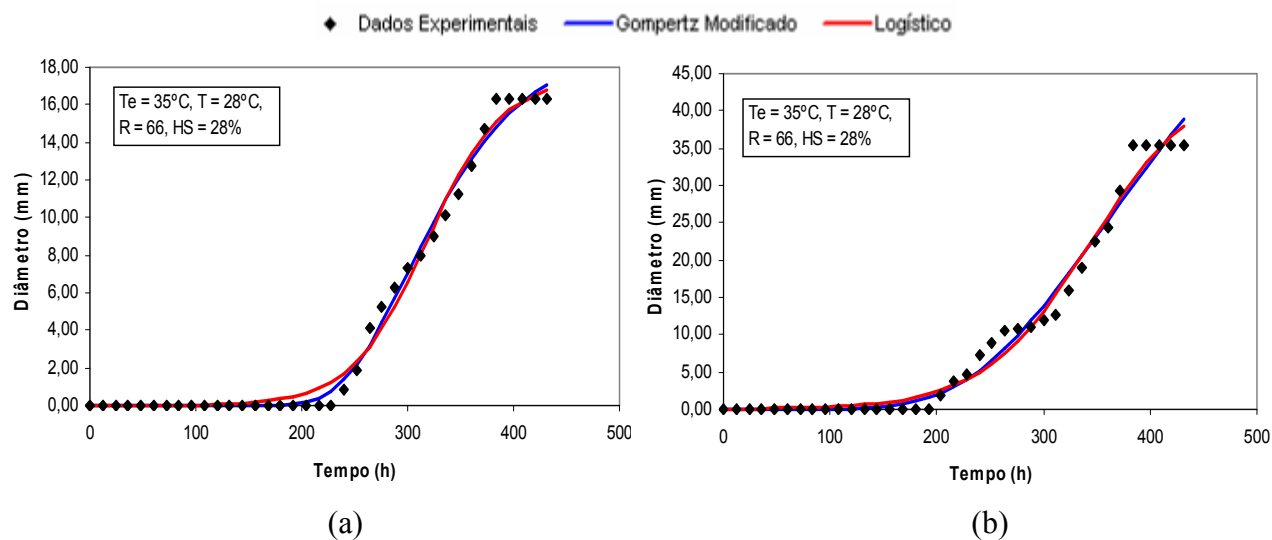


Figura A.41. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 1 e (b) Réplica 3.

Ensaio 9: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 46 e Espaço livre da garrafa = 18%.

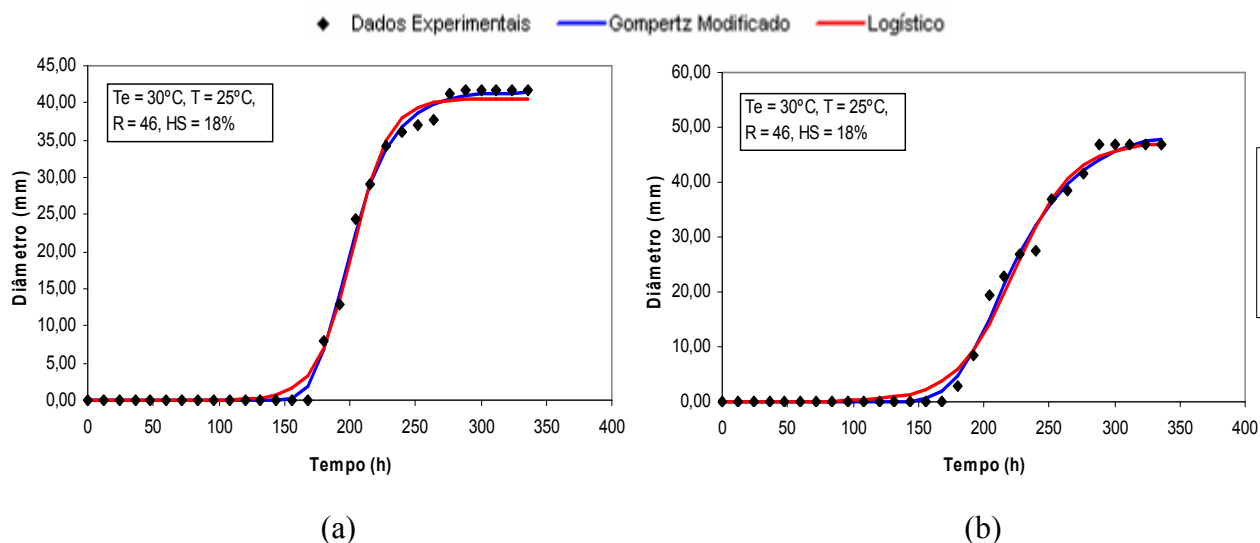


Figura A.42. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 2 e (b) Réplica 4.

Ensaio 10: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, *Ratio* = 46 e Espaço livre da garrafa = 18%.

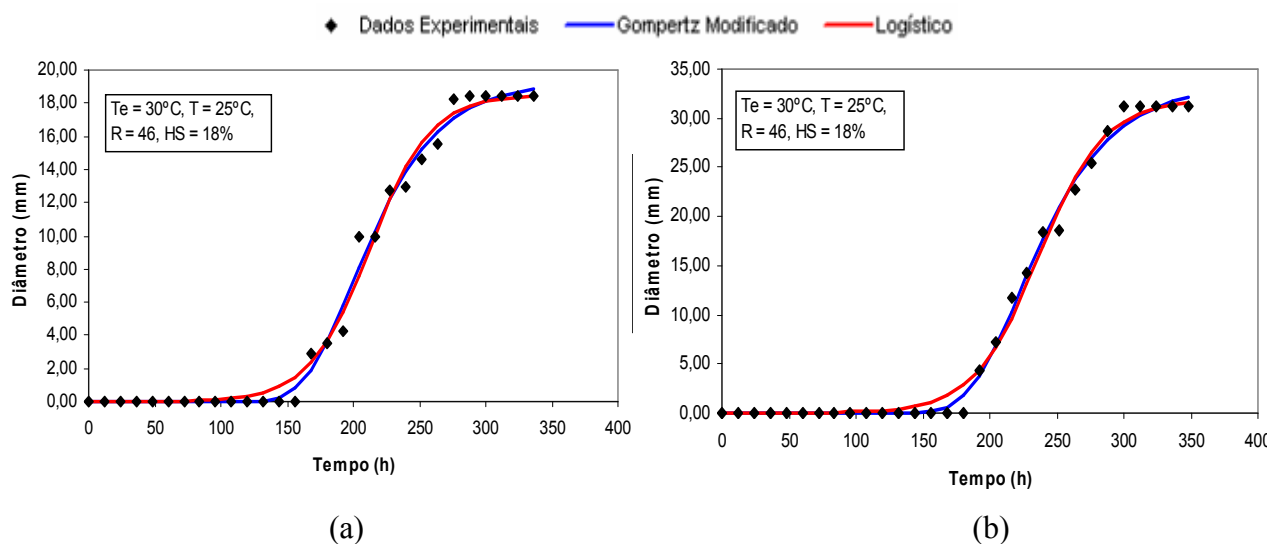


Figura A.43. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 4 e (b) Réplica 2.

Ensaio 11: Temperatura de produção dos esporos = 30°C, Temperatura de crescimento = 25°C, $Ratio = 46$ e Espaço livre da garrafa = 18%.

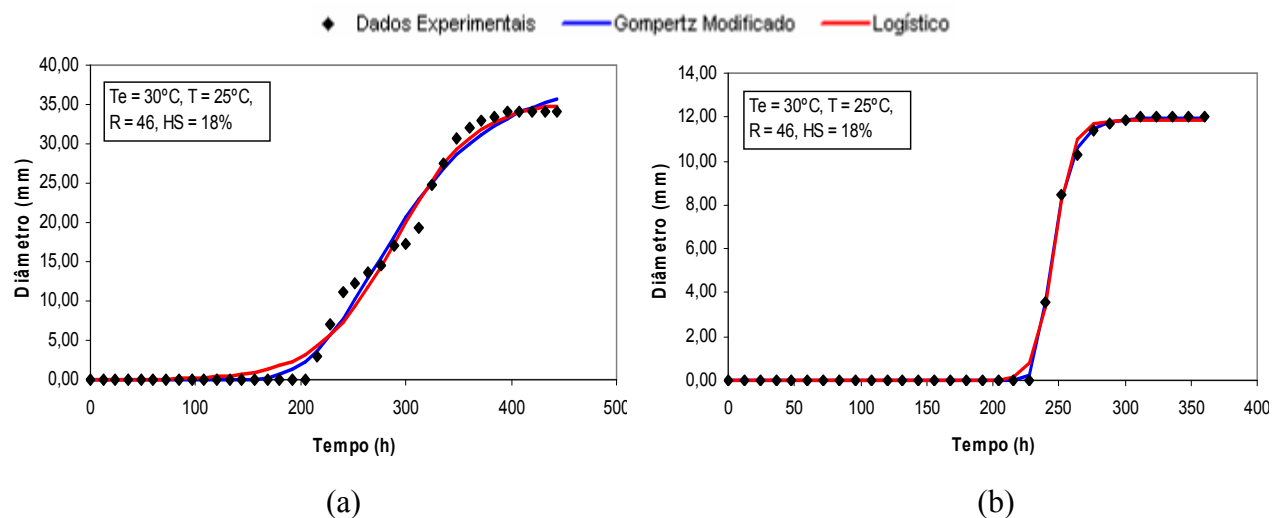


Figura A.44. Ajuste dos modelos de Gompertz Modificado e Logístico aos dados experimentais de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão, obtidos por medida de diâmetro: (a) Réplica 3 e (b) Réplica 2.

ANEXO II
AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DO AJUSTE DOS MODELOS DE
GOMPERTZ MODIFICADO E LOGÍSTICO AOS DADOS
EXPERIMENTAIS DE CRESCIMENTO

II.A. Avaliação estatística do ajuste do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico aos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi

A Tabela A.1 apresenta os parâmetros estatísticos para avaliar o ajuste dos dois modelos primários empregados. Serão mostrados apenas os valores para a segunda réplica escolhida.

Tabela A.1. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico ao crescimento de *N. fischeri* em suco de abacaxi.

Ensaio	Modelo	r^2	MSE	Bias	Exatidão
1	Gompertz	0,9944	1,03002	1,0095	1,0346
	Logístico	0,9951	0,87357	1,0129	1,0288
2	Gompertz	0,9956	0,39947	1,0484	1,0722
	Logístico	0,9982	0,16202	1,0217	1,0338
3	Gompertz	0,9866	3,99207	1,1018	1,1772
	Logístico	0,9933	1,95058	1,0663	1,1117
4	Gompertz	0,9952	0,40751	1,0460	1,0739
	Logístico	0,9968	0,26429	1,0121	1,0364
5	Gompertz	0,9943	0,53919	1,0132	1,0406
	Logístico	0,9945	0,51493	1,0182	1,0361
6	Gompertz	0,9910	0,30001	1,0069	1,0254
	Logístico	0,9877	0,39924	1,0104	1,0290
7	Gompertz	0,9965	0,84967	1,0208	1,0593
	Logístico	0,9958	1,05212	1,0051	1,0409
8	Gompertz	0,9884	1,86076	1,0279	1,0744
	Logístico	0,9902	1,49587	1,0182	1,0575
9	Gompertz	0,9984	0,25662	1,0220	1,0524
	Logístico	0,9980	0,31618	0,9770	1,0479
10	Gompertz	0,9981	0,37831	1,0092	1,0323
	Logístico	0,9970	0,55288	0,9964	1,0267
11	Gompertz	0,9959	1,42628	0,9793	1,0560
	Logístico	0,9928	2,50076	0,9727	1,0700

*Os valores em negrito indicam o modelo de melhor ajuste.

II.B. Avaliação estatística do ajuste do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico aos dados de crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi

A Tabela A.2 apresenta os parâmetros estatísticos para avaliar o ajuste dos dois modelos primários empregados. Serão mostrados apenas os valores para a segunda réplica escolhida.

Tabela A.2. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico ao crescimento de *B. nivea* em suco de abacaxi.

Ensaio	Modelo	r^2	MSE	Bias	Exatidão
1	Gompertz	0,9954	0,00818	1,0035	1,0107
	Logístico	0,9916	0,01499	1,0056	1,0137
2	Gompertz	0,9986	0,22116	1,0162	1,0279
	Logístico	0,9992	0,11714	0,9998	1,0148
3	Gompertz	0,9740	7,31570	2,7546	2,8744
	Logístico	0,9920	5,05592	1,1542	1,2030
4	Gompertz	0,9997	0,00875	0,9995	1,0024
	Logístico	0,9987	0,04327	0,9992	1,0052
5	Gompertz	0,9907	0,00664	1,0020	1,0176
	Logístico	0,9871	0,00952	0,9998	1,0206
6	Gompertz	0,9945	1,65441	1,0126	1,0307
	Logístico	0,9946	1,50253	1,0031	1,0277
7	Gompertz	0,9985	0,12791	1,0031	1,0124
	Logístico	0,9980	0,17407	1,0051	1,0121
8	Gompertz	0,9964	0,22257	1,0217	1,0407
	Logístico	0,9970	0,17255	1,0148	1,0257
9	Gompertz	0,9987	0,29095	1,0008	1,0080
	Logístico	0,9967	0,74012	1,0028	1,0139
10	Gompertz	0,9985	0,18360	0,9878	1,0240
	Logístico	0,9962	0,49418	0,9558	1,0681
11	Gompertz	0,9899	0,16095	1,0645	1,1076
	Logístico	0,9950	0,07716	1,0367	1,0617

*Os valores em negrito indicam o modelo de melhor ajuste.

II.C. Avaliação estatística do ajuste do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico aos dados de crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão

A Tabela A.3 apresenta os parâmetros estatísticos para avaliar o ajuste dos dois modelos primários empregados. Serão mostrados apenas os valores para a segunda réplica escolhida.

Tabela A.3. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico ao crescimento de *N. fischeri* em suco de mamão.

Ensaio	Modelo	r^2	MSE	Bias	Exatidão
1	Gompertz	0,9992	0,05854	1,0099	1,0157
	Logístico	0,9995	0,03240	1,0013	1,0033
2	Gompertz	-	-	-	-
	Logístico	-	-	-	-
3	Gompertz	0,9947	0,23688	1,0016	1,0259
	Logístico	0,9906	0,41840	1,0055	1,0291
4	Gompertz	0,9920	0,31794	1,0087	1,0343
	Logístico	0,9867	0,53025	1,0111	1,0444
5	Gompertz	0,9970	0,34454	1,0078	1,0161
	Logístico	0,9977	0,24445	1,0025	1,0091
6	Gompertz	0,9985	0,14543	1,0029	1,0093
	Logístico	0,9975	0,22776	0,9976	1,0084
7	Gompertz	0,9930	2,22827	0,9813	1,0506
	Logístico	0,9901	3,07732	0,9667	1,0683
8	Gompertz	0,9982	0,24583	1,0062	1,0189
	Logístico	0,9985	0,20609	1,0035	1,0113
9	Gompertz	0,9932	0,66402	1,0097	1,0506
	Logístico	0,9951	0,46740	0,9979	1,0545
10	Gompertz	0,9960	0,17113	1,0173	1,0500
	Logístico	0,9965	0,14418	1,0183	1,0358
11	Gompertz	0,9963	0,55732	1,0102	1,0283
	Logístico	0,9929	1,04346	1,0139	1,0289

*Os valores em negrito indicam o modelo de melhor ajuste.

- Dados não disponíveis.

II.D. Avaliação estatística do ajuste do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico aos dados de crescimento de *B. nivea* em suco de mamão

A Tabela A.4 apresenta os parâmetros estatísticos para avaliar o ajuste dos dois modelos primários empregados. Serão mostrados apenas os valores para a segunda réplica escolhida.

Tabela A.4. Parâmetros estatísticos para validar o emprego do Modelo de Gompertz Modificado e do Modelo Logístico ao crescimento de *B. nivea* em suco de mamão.

Ensaio	Modelo	r^2	MSE	Bias	Exatidão
1	Gompertz	0,9997	0,00894	1,0000	1,0036
	Logístico	0,9986	0,04670	0,9986	1,0110
2	Gompertz	0,9907	0,63643	1,0148	1,0420
	Logístico	0,9934	0,44148	1,0154	1,0329
3	Gompertz	0,9929	0,50744	1,0166	1,0441
	Logístico	0,9918	0,55446	1,0206	1,0402
4	Gompertz	0,9983	0,16394	0,9983	1,0196
	Logístico	0,9958	0,37517	0,9925	1,0368
5	Gompertz	0,9969	0,00400	1,0045	1,0136
	Logístico	0,9966	0,00423	1,0035	1,0096
6	Gompertz	0,9956	0,22414	1,0054	1,0192
	Logístico	0,9953	0,23109	1,0042	1,0173
7	Gompertz	0,9973	0,09796	1,0085	1,0287
	Logístico	0,9943	0,19829	1,0058	1,0276
8	Gompertz	0,9830	3,01937	1,0183	1,0839
	Logístico	0,9837	2,76507	1,0247	1,0881
9	Gompertz	0,9937	2,45716	0,9838	1,0508
	Logístico	0,9895	4,00244	0,9813	1,0662
10	Gompertz	0,9957	0,74441	1,0081	1,0260
	Logístico	0,9927	1,20368	1,0102	1,0295
11	Gompertz	0,9997	0,00942	1,0002	1,0038
	Logístico	0,9983	0,04997	1,0024	1,0092

*Os valores em negrito indicam o modelo de melhor ajuste.